



INSTITUTO POLITÉCNICO
DE VIANA DO CASTELO

Avaliação do metabolismo de carbono em *Actinidia deliciosa* cv. "Hayward" infetada com *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* e do efeito do tratamento biológico com *Bacillus subtilis*

Fernando José de Azevedo Silva Santos



Instituto Politécnico de Viana do Castelo

**Escola Superior
Agrária**

**Avaliação do metabolismo de carbono em *Actinidia deliciosa* cv.
"Hayward" infetada com *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* e do efeito
do tratamento biológico com *Bacillus subtilis***

Tese de Mestrado

Mestrado de Agricultura Biológica

Fernando José de Azevedo Silva Santos

Orientação de Professora Doutora Maria Luísa Roldão Marques Moura

Co-orientação de Professora Doutora Maria da Conceição Lopes Vieira dos Santos

Refoios do Lima, novembro de 2018

Índice

Declaração	i
Agradecimentos	iii
Resumo	v
Abstract.....	vii
Abreviaturas.....	ix
Lista de Figuras	xi
Lista de Quadros	xvi
1 Introdução	1
1.1 A cultura da actinídea	1
1.2 Caracterização morfológica	2
1.3 Importância alimentar do kiwi	5
1.4 Importância económica da actinídea.....	6
1.5 Proteção fitossanitária e acidentes fisiológicos	9
1.5.1 Proteção fitossanitária	9
1.5.2 Acidentes fisiológicos	10
1.6 Cancro bacteriano da actinídea	11
1.6.1 História e distribuição geográfica da doença	11
1.6.2 Taxonomia.....	14
1.6.3 Caracterização morfológica e cultural.....	18
1.6.4 Sintomatologia	19
1.6.5 Disseminação	23
1.7 Meios de proteção	25
1.7.1 Meios de proteção culturais.....	25
1.7.2 Meios de proteção biológicos.....	26

1.7.2.1 Bacteriófagos	26
1.7.2.2. <i>Bacillus subtilis</i>	27
1.7.2.3 <i>Trichoderma</i>	28
1.7.3 Meios de proteção química	28
1.7.3.1 Cobre	28
1.7.3.2 Estreptomicina	29
1.7.3.3 Quitosana	29
1.7.3.4 Péptidos antimicrobianos.....	30
1.7.3.5 Indutores de defesa das plantas	30
1.8 Metabolismo do carbono e o rendimento das culturas	31
1.9 Avaliação da performance fotossintética em <i>Pseudomonas spp.</i>	32
1.9.1 Fotossíntese – <i>Photosynthetic Efficiency Analyser</i> (PEA).....	32
1.9.2 Trocas gasosas - <i>Infrared Gas Analyzer</i> (IRGA)	33
1.10 Objetivos	34
2 Material e métodos	36
2.1 Caracterização dos pomares, tratamentos e colheita de amostras	36
2.2 Quantificação de pigmentos.....	38
2.3 Avaliação da fluorescência da clorofila	40
2.4 Trocas gasosas	42
2.5 RuBisCo.....	43
2.6 Açúcares solúveis totais (AST).....	44
2.7 Amido	45
2.8 Avaliação da qualidade dos frutos em 2017	45
2.9 Análise estatística dos dados.....	47
3 Resultados.....	48
3.1 Quantificação de pigmentos.....	48

3.2 Avaliação da fluorescência da clorofila.....	50
3.3 Avaliação das trocas gasosas	53
3.4 Quantificação da RuBisCo.....	55
3.5 Quantificação de açúcares solúveis totais.....	56
3.6 Quantificação de amido	56
3.7 Avaliação da qualidade dos frutos em 2017	57
4 Discussão	60
5 Conclusões.....	67
Bibliografia.....	70

Declaração

Este projeto está integrado num estudo mais vasto de análise relacionada com o cancro bacteriano em *Actinidia deliciosa* provocado por *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae*. Além da orientação das Professoras Luísa Moura e Conceição Santos, este trabalho teve ainda a cossupervisão laboratorial/prático e teórica, dos Mestres Nuno Ponte, Sara Sario e Rafael Mendes e a parceria com os Professores Carlos Correia e José Moutinho-Pereira (UTAD) nas análises *in vivo*.

Partes deste trabalho foram já publicadas em diferentes congressos:

Fernando Santos, Nuno Ponte, Sara Sario, Mário Freitas, Conceição Santos, Carlos Correia, José Moutinho, Luísa Moura. Monitorization of *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* in kiwifruit leaves: chlorophyll fluorescence and pigment level. *III Jornadas de Engenharia Agronómica* (UTAD). Forma de apresentação: Poster 7/03/2018.

Fernando Santos, Nuno Mariz-Ponte, Sara Sario, Rafael Mendes, Carlos Correia, José Moutinho-Pereira, Conceição Santos and Luísa Moura. Evaluation of leaf gas Exchange in old kiwifruit orchard (>30 years) under bacterial canker and effects of the biological control with *Bacillus subtilis*. 2º Encontro de Biologia Funcional e Biotecnologia de Plantas (FCUP). Forma de apresentação: Poster 19/10/2018.

Luísa Moura, Nuno Mariz-Ponte, **Fernando Santos**, Sara Sario, Rafael Mendes, Carlos Correia, Raúl Rodrigues, José Moutinho-Pereira, Conceição Santos. Avaliação das trocas gasosas das folhas em plantas de Actinídea infetadas com *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* e efeito do tratamento com *Bacillus subtilis*. 4º Simpósio Nacional de Fruticultura, Comunicação Oral, sessão de sanidade 29/11/2018.

Na sequência deste trabalho, prestei apoio prático a outro projeto que estava a decorrer em simultâneo no laboratório, mas que, no entanto, não é apresentado neste relatório. Os resultados desse mesmo estudo subordinado – stress oxidativo, foram sujeitos a apresentação no qual participo como co-autor.

Freitas, Mário; Ponte, Nuno; Sario, Sara; Mendes, Rafael; **Santos, Fernando**; Santos, Conceição; Moura, Luísa. Monitorization of *Actinidia deliciosa* performance under bacterial infection: an oxidative evaluation of leaves. *11TH MEETING OF YOUNG*

RESEARCHERS – IJUP (9-02-2018). ISBN: 978-989-746-158-3, p.377. Forma de apresentação: Poster 9/03/2018.

M. Freitas, N. Ponte, S. Sario, R. Mendes, **F. Santos**, C. Santos, L. Moura. *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* infection in *Actinidia deliciosa*: evaluation of the oxidative status of asymptomatic versus symptomatic plants. *III Jornadas de Engenharia Agronómica* (UTAD). Forma de apresentação: Poster 7/03/2018.

Agradecimentos

A concretização deste trabalho não teria sido possível sem a colaboração, estímulo e empenho de diversas pessoas. Gostaria, por este facto, de expressar toda a minha gratidão e apreço a todos aqueles que, direta ou indiretamente, contribuíram para a sua realização. A todos quero manifestar os meus sinceros agradecimentos.

A Deus, por estar presente em todos os momentos e, por não me deixar desistir perante as dificuldades inesperadas encontradas no caminho e na vida.

Em especial, agradeço à minha orientadora, Professora Doutora Luísa Moura, por mais uma vez me ter dado a oportunidade de me orientar em mais uma etapa académica. Agradeço pelos conselhos, ajuda e conhecimento partilhado, pelo incentivo, interesse e confiança depositados em mim para a realização desta Tese.

À Professora Doutora Conceição Santos pela disponibilidade, ajuda e incentivo prestado no decorrer deste trabalho, e pelo bom acolhimento e atenção prestada no meu primeiro contacto com a Faculdade de Ciências da Universidade Do Porto.

Aos Professores Doutores Carlos Correia e José Moutinho-Pereira, da Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro, por toda a ajuda, dedicação e empenho na realização das análises de campo.

Ao Professor Doutor Miguel Brito, pela colaboração no tratamento estatístico dos dados.

Aos membros do iB₂ Lab (Integrative Biology & Biotechnology Laboratory), Mestres Nuno Ponte, Rafael Mendes e Sara Sario quero agradecer pela experiência, partilha de conhecimento e pela ajuda prestada na elaboração dos trabalhos laboratoriais, apresentações em congressos e no decorrer de todo o trabalho. Em especial quero deixar um agradecimento ao Mestre Nuno Ponte pela ajuda, dedicação e contributo que foram imprescindíveis na realização dos trabalhos práticos e na elaboração do trabalho teórico.

À Mestre Adriana Vaz agradeço a sua disponibilidade para a recolha de amostras de frutos e folhas no seu pomar, imprescindíveis à concretização do presente trabalho, pelos conselhos e ajuda prestada na elaboração do trabalho teórico.

Aos meus companheiros de Mestrado agradeço por terem enriquecido esta etapa com a vossa amizade, experiências, conhecimentos por todos os momentos fantásticos que passamos e tornaram o MAB inesquecível.

Ao João Machado e ao Filipe Pereira tenho de agradecer a amizade e companheirismo, porque apesar da distância o apoio e o incentivo para a conclusão deste trabalho veio sempre quer do Alentejo, quer de Angola.

Ao Paulo tenho de agradecer a amizade, o apoio e incentivo no decorrer do trabalho.

À minha namorada, Cláudia, com quem sei que passarei muitos e muitos momentos de felicidade agradeço toda a ajuda e conselhos prestados no decorrer deste trabalho. Tenho de agradecer o incentivo, o apoio, o carinho, a paciência e a compreensão, e por todas as vezes que, no momento certo, me abstraiu do universo da actinídea e de Psa.

Agradeço, por último, mas não menos importante, à minha família, em especial aos meus pais, Fernando e Lucinda, e à minha irmã, Ana, pelo apoio e incentivo para a conclusão deste trabalho. Pela forma de como me incutiram para a vida de modo a fazer tudo o melhor possível, e por toda a confiança que me transmitem para realizar os meus sonhos. Ao meu avô, Fernando, que sempre me apoiou e incentivou a correr atrás dos meus sonhos e a acreditar em mim, por me ter apoiado em toda a Licenciatura e no decorrer do Mestrado. A todos, os meus eternos agradecimentos.

Pretendo demonstrar o meu agradecimento, a todos aqueles que, de algum modo, tornaram possível a realização do presente trabalho.

A todos o meu sincero e profundo agradecimento.

Resumo

Pseudomonas syringae pv. *actinidiae* (Psa), agente causal do cancro bacteriano da actínídea, encontra-se disseminada pelas principais regiões produtoras de kiwi em todo o mundo causando graves prejuízos. Pela sua perigosidade foi incluída na Lista A2 dos organismos de quarentena da EPPO (Organização Europeia e Mediterrânica da Proteção de Plantas). Psa apresenta variabilidade genética, sendo conhecidas atualmente 5 populações com diferentes virulências, designadas biovar 1, 2, 3, 5, e 6 ou Psa1, 2, 3, 5 e 6. A biovar 3 é a mais agressiva e responsável pela crise pandémica de 2008 que se espalhou pelas regiões produtoras de kiwi, incluindo Portugal, onde foi detetada em 2010 em plantas de *Actinidia deliciosa* cv. *Summer*.

O cancro bacteriano tem vindo a provocar quebras produtivas e perdas económicas afetando toda a fileira do kiwi, o que associado ao facto de não existir um tratamento eficaz para o combate da bactéria tende a agravar a doença, e contribuir para uma maior disseminação nos pomares.

Este trabalho tem por objetivo compreender a forma como Psa poderá afetar plantas de *A. deliciosa* cv. “Hayward”, principalmente na região foliar, e perceber quais são as respostas fotossintéticas na presença da bactéria, e avaliar se a aplicação do agente de controlo biológico *Bacillus subtilis* (Serenade Max[®]), autorizado em Portugal como meio de proteção contra Psa, altera a performance fotossintética das plantas sintomáticas, reduzindo a sua suscetibilidade à doença. Este estudo desenvolveu-se em 2017 num pomar da região de Entre-Douro-e-Minho, com plantas de *A. deliciosa* cv. “Hayward” com idade aproximada de 6 e 30 anos, onde tinha sido anteriormente identificada a presença de Psa biovar 3.

Antes da colheita dos frutos, selecionaram-se folhas de plantas com e sem sintomas de Psa, tendo sido esta amostragem realizada em dois sectores distintos do pomar, um tratado com *B. subtilis* (Serenade Max[®]) e o outro sem tratamento.

A avaliação da fluorescência da clorofila e das trocas gasosas foram realizadas *in vivo*, através de recurso a um fluorímetro portátil (PEA – *Photosynthetic Efficiency Analyser*) e um sistema de fotossíntese portátil (IRGA – *Infrared Gas Analyser*), respetivamente. Para a quantificação de pigmentos, amido, açúcares e RuBisCo as folhas foram recolhidas e processadas em laboratório. A qualidade dos frutos foram avaliados através da colheita de frutos de plantas com e sem aplicação de *B. subtilis*, distinguindo o factor idade do pomar.

Os resultados obtidos neste trabalho demonstraram que Psa está a limitar o potencial de assimilação de carbono, nomeadamente através da redução da taxa de transpiração (E), condutância estomática (gs) e assimilação do CO₂ (A). No entanto, estes fatores poderão estar envolvidos na regulação estomática, onde o possível encerramento dos estomas poderá ser devido a danos causados Psa, ou funcionar como um mecanismo de defesa da planta contra a infeção causada pela bactéria. Contudo, o efeito do tratamento com *B. subtilis* apresenta um efeito mitigante sobre esta quebra observada na assimilação de carbono e nas trocas gasosas foliares. Acrescido a esse fator, em plantas não infetadas, *B. subtilis* estimula estes parâmetros.

Os níveis de açúcares solúveis totais (AST) nas folhas de plantas sintomáticas são incrementados. Este fator poderá ocorrer devido a reação de defesa das plantas face ao agente patogénico que recruta açúcares simples por clivagem de açúcares complexos e promove o seu transporte para o patossistema.

A aplicação de *B. subtilis* como meio de luta biológico contra Psa não afetou a qualidade total dos frutos de kiwi, nomeadamente o diâmetro transversal e longitudinal, a matéria seca, a acidez titulável, a firmeza da polpa e o pH.

Palavras Chave: Actinidia, Psa, fluorescência da clorofila, tocas gasosas, Serenade Max[®]

Abstract

Pseudomonas syringae pv. *Actinidiae* (Psa), the causative agent of actinidia bacterial cancer, is widespread in the major kiwi producing regions of the world causing serious damage. Due to its dangerous nature, it has been included in List A2 of the EPPO (European and Mediterranean Plant Protection Organization) as quarantine bacteria. Psa presents genetic variability, and currently 5 populations are known with different virulence, known as biovar 1, 2, 3, 5 and 6 or Psa1, 2, 3, 5 and 6. Biovar 3 is the most aggressive and responsible for the pandemic crisis of 2008 that has spread to the kiwi producing regions, including Portugal, where it was detected in 2010 in plants of *Actinidia deliciosa* cv. *Summer*.

Bacterial cancers have been causing productive losses and economic losses affecting the entire kiwi line, which, combined with the lack of effective treatment for the bacterium, are likely to aggravate the disease and contribute to a greater spread in the orchards.

This work aims to understand how Psa can affect plants of *A. deliciosa* cv. "Hayward", especially in the leaf region, and to determine the photosynthetic responses in the presence of the bacterium, and to evaluate whether the application of the biological control agent *Bacillus subtilis* (Serenade Max®) authorized in Portugal as a means of protection against Psa changes the photosynthetic performance of the symptomatic plants, reducing their susceptibility to the disease. This study was developed in 2017 in an orchard of the Entre-Douro-e-Minho region, with plants of *A. deliciosa* cv. "Hayward", aged approximately 6 and 30 years old, where the presence of Psa biovar 3 had previously been identified. Before the fruits were harvested, leaves of plants with and without Psa symptoms were selected and this sampling was performed in two sectors of the orchard, one treated with *B. subtilis* (Serenade Max®) and the other without treatment.

The evaluation of chlorophyll fluorescence and gas exchange were performed in vivo using a portable fluorescence analyzer (PEA) and an infrared gas analyzer (IRGA), respectively. For the quantification of pigments, starch, sugars and RuBisCo the leaves were collected and processed in the laboratory. The overall kiwifruit quality were evaluated by harvesting fruits of plants with and without application of *B. subtilis*, distinguishing the age factor of the orchard.

The results obtained in this work demonstrated that Psa is limiting the potential of carbon assimilation, namely through the reduction of transpiration rate (E), stomatal conductance

(gs) and CO₂ assimilation (A). However, these factors may be involved in stomatal regulation, where the possible closure of the stomas may be due to damage caused Psa, or function as a defense mechanism of the plant against the bacteria. However, the effect of *B. subtilis* treatment has a mitigating effect on this decline in carbon assimilation and foliar gas exchange. In addition to this factor, in non-infected plants, *B. subtilis* stimulates these parameters.

The levels of total soluble sugars (AST) in leaves of symptomatic plants are increased. This factor may occur due to the defense reaction of the plants against the pathogen that recruits simple sugars by cleavage of complex sugars and promotes their transport to the pathosystem.

The application of *B. subtilis* as a biological control against Psa did not affect the overall kiwifruit quality, namely the longitudinal and length diameters of fruits, the total soluble solids content, firmness, pH, titratable acidity and dry matter.

Keywords: Actinidia, Psa, chlorophyll fluorescence, gas exchange, Serenade Max[®]

Abreviaturas

% - Percentagem;

µg – Micrograma;

µL – Microlitro;

µm – Micrómetro;

µmol.m⁻².s⁻¹ – Micromol por metro quadrado por segundo;

AST – Açúcares Solúveis Totais;

cm – Centímetro;

cv. – Cultivar;

g – Grama;

ha – Hectare;

IU – International Unit – Unidades Internacionais;

Kcal – Quilocalorias;

m – Metro;

mg – Miligrama;

mg/g – Miligrama por Grama;

mg/gMF – Miligrama por Grama de Matéria Fresca;

mL – Mililitro;

mol.m⁻².s⁻¹ – Micromol por metro quadrado por segundo;

nm – Nanometro;

°C – Graus Celcius;

Psa – *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae*;

pv. – Patovar;

R² – Coeficiente de Corelação;

s – Segundo;

SST – Sólidos Solúveis Totais;

ton – Tonelada;

ufc/g – Unidade de Formação de Colonias por Grama;

v/v – Rácio volume por volume;

xg – Unidade de Aceleração – Força g;

Lista de Figuras

Figura 1 – Flores de <i>A. deliciosa</i> Flor masculina (à esquerda) e feminina (à direita). Foto do autor.	3
Figura 2 – Caracterização morfológica do kiwi, cv. “Hayward”. Adaptado de Guo <i>et al.</i> , 2013 e Huang, 2016. Fotos do autor.	4
Figura 3 – Estados fenológicos da <i>A. deliciosa</i> cv. “Hayward”. Adaptado de: Salinero <i>et al.</i> , 1996; Oliveira, 2004; Salinero <i>et al.</i> , 2009. Fotos do autor.	4
Figura 4 – Produção Europeia de kiwi entre 1977 e 2017. Fonte: FAOSTAT, 2019.	7
Figura 5 – Produção mundial de kiwi entre 1970 e 2017. Fonte: FAOSTAT, 2019.	7
Figura 6 – Produção em Portugal de kiwi entre 1987 e 2017. Fonte: FAOSTAT, 2019. ...	8
Figura 7 – Produção de kiwi em Portugal desde 2013 até 2017. Fonte: INE, 2018.	8
Figura 8 – Mapa de distribuição de <i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>actinidiae</i> em maio de 2018. Fonte: EPPO, 2018b.	12
Figura 9 – Distribuição geográfica dos diferentes tipos de biovars de <i>Psa.</i> (Vanneste, 2017).....	17
Figura 10 – Morfologia de três biovars de <i>Psa</i> através de microscopia eletrónica. a) – <i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>actinidiae</i> biovar 3, com dimensão de $2,4 \pm 0,3 \mu\text{m} \times 1,1 \pm 0,05 \mu\text{m}$ (Sawada <i>et al.</i> , 2015); b) – <i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>actinidiae</i> biovar 5, com $2,5 \pm 0,4 \mu\text{m} \times 0,9 \pm 0,1 \mu\text{m}$ (Sawada <i>et al.</i> , 2014); c) – <i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>actinidiae</i> biovar 6, com dimensão de $2,5 \pm 0,5 \mu\text{m} \times 1,2 \pm 0,1 \mu\text{m}$ (Sawada <i>et al.</i> , 2016).	18
Figura 11 – Exemplos de diferentes colónias de <i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>actinidiae</i> . Culturas obtidas em meio de agar nutritivo suplementado com sacarose 3% (NSA) incubado a 23-25°C durante 72 horas, a) - <i>Psa</i> biovar 1; b) - <i>Psa</i> biovar 2; c) - <i>Psa</i> biovar 3; d) - <i>Psa</i> biovar 4 (Ferrante & Scortichini 2015); e) - <i>Psa</i> biovar 5, cultura obtida em agar padrão (Standard Methods Agar) incubada durante 72h a 27 °C (Sawanda <i>et al.</i> , 2014); f) - <i>Psa</i> biovar 6, cultura obtida em agar padrão (Standard Methods Agar) incubada durante 72 h a 27 °C (Sawanda <i>et al.</i> , 2016).	19

Figura 12 – a) Coloração avermelha por baixo do córtex, <i>A. deliciosa</i> cv. “Hayward” (Foto do autor); b) produção de exsudados esbranquiçados na altura da floração (Vanneste, 2010).	20
Figura 13 – Evolução das pontuações necróticas em duas fases do ano, <i>A. deliciosa</i> cv. “Hayward”. a) e b) fotografias recolhidas a 1 de maio de 2018; c) fotografia recolhida a 18 de outubro. Fotos do autor.	20
Figura 14 – Murchidão dos rebentos, em <i>A. deliciosa</i> cv. “Hayward”, infetados com <i>Psa</i> . Fotos do autor.	21
Figura 15 – Necroses nos botões florais, <i>A. deliciosa</i> cv. “Hayward”, em diferentes contextos. a) Murchidão de um lançamento com botões florais necrosados; b) Lançamento do ano com folhas sintomáticas de pontuações necróticas e botões florais necrosados; c) e d) Botões florais necrosados. Fotos do Autor.	21
Figura 16 – Produção de exsudados em <i>A. deliciosa</i> cv. “Hayward”. a) e b) Produção de exsudados amarelados. Fotos do Autor.	22
Figura 17 – Ciclo de vida de <i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>actinidiae</i> , descrevendo sintomas, doenças e meios de transmissão. Adaptado de Kim <i>et al.</i> , 2017 e Vanneste, 2017.	25
Figura 18 – Representação esquemática das plantas em estudo.	38
Figura 19 – Avaliação da fluorescência da clorofila, a) avaliação em folhas iluminadas, b) avaliação em folhas adaptadas ao escuro (30/9/2017). Fotos do autor.	41
Figura 20 – Molas usadas para a adaptação das folhas ao escuro durante 30 minutos para a avaliação da fluorescência da clorofila (30/9/2017). Fotos do autor.	41
Figura 21 – Avaliação das trocas gasosas (30/9/2017). Fotos do autor.	42
Figura 22 – Quantificação de pigmentos foliares em plantas de <i>A. deliciosa</i> cv. “Hayward”: I – Clorofila <i>a</i> (Chl <i>a</i>) em miligrama por grama de matéria fresca; II – Clorofila <i>b</i> (Chl <i>b</i>) em miligrama por grama de matéria fresca; III – Antocianinas em miligrama por grama de matéria fresca; IV – Carotenoides em miligrama por grama de matéria fresca; V – Rácio clorofila <i>a/b</i> . NA – Plantas novas sem <i>B. subtilis</i> ; NAB – Plantas novas assintomáticas com <i>B. subtilis</i> ; NS – Plantas novas sintomáticas sem <i>B. subtilis</i> ; NSB – Plantas novas sintomáticas com <i>B. subtilis</i> ; VA – Plantas velhas sem <i>B. subtilis</i> ; VAB – Plantas velhas com <i>B. subtilis</i> ; VS – Plantas velhas sem <i>B. subtilis</i> ; VSB – Plantas velhas sintomáticas com <i>B.</i>	

subtilis. As diferentes letras sobre cada condição indicam a existência de diferenças significativas ($p < 0,05$) entre estas, de acordo com o teste de Tukey HSD (one way ANOVA), e as barras de erro indicam o desvio padrão..... 49

Figura 23 – Avaliação da fluorescência da clorofila em folhas de *A. deliciosa* cv. “Hayward”: **I** – Eficiência do PSII (ϕ PSII); **II** – Dissipação Fotoquímica (qP); **III** – Fração dos centros de reação do PSII abertos (qL); **IV** – Dissipação não fotoquímica (qN). NA – Plantas novas sem *B. subtilis*; NAB – Plantas novas assintomáticas com *B. subtilis*; NS – Plantas novas sintomáticas sem *B. subtilis*; NSB – Plantas novas sintomáticas com *B. subtilis*; VA – Plantas velhas sem *B. subtilis*; VAB – Plantas velhas com *B. subtilis*; VS – Plantas velhas sem *B. subtilis*; VSB – Plantas velhas sintomáticas com *B. subtilis*. As diferentes letras sobre cada condição indicam a existência de diferenças significativas ($p < 0,05$) entre estas, de acordo com o teste de Tukey HSD (one way ANOVA), e as barras de erro indicam o desvio padrão..... 50

Figura 24 – Avaliação da fluorescência da clorofila em folhas de *A. deliciosa* cv. “Hayward”: **I** – Amplitude da fluorescência (F_v); **II** – Fluorescência máxima (F_m). NA – Plantas novas sem *B. subtilis*; NAB – Plantas novas assintomáticas com *B. subtilis*; NS – Plantas novas sintomáticas sem *B. subtilis*; NSB – Plantas novas sintomáticas com *B. subtilis*; VA – Plantas velhas sem *B. subtilis*; VAB – Plantas velhas com *B. subtilis*; VS – Plantas velhas sem *B. subtilis*; VSB – Plantas velhas sintomáticas com *B. subtilis*. As diferentes letras sobre cada condição indicam a existência de diferenças significativas ($p < 0,05$) entre estas, de acordo com o teste de Tukey HSD (one way ANOVA), e as barras de erro indicam o desvio padrão..... 51

Figura 25 – Avaliação da fluorescência da clorofila em folhas de *A. deliciosa* cv. “Hayward”: **I** – Eficiência máxima de PSII (F_v / F_m); **II** – Eficiência fotoquímica efetiva do PSII (F'_v / F'_m). NA – Plantas novas sem *B. subtilis*; NAB – Plantas novas assintomáticas com *B. subtilis*; NS – Plantas novas sintomáticas sem *B. subtilis*; NSB – Plantas novas sintomáticas com *B. subtilis*; VA – Plantas velhas sem *B. subtilis*; VAB – Plantas velhas com *B. subtilis*; VS – Plantas velhas sem *B. subtilis*; VSB – Plantas velhas sintomáticas com *B. subtilis*. As diferentes letras sobre cada condição indicam a existência de diferenças significativas ($p < 0,05$) entre estas, de acordo com o teste de Tukey HSD (one way ANOVA), e as barras de erro indicam o desvio padrão..... 52

Figura 26 – Avaliação da fluorescência da clorofila em folhas de *A. deliciosa* cv. “Hayward”: **I** – Taxa de Transporte de elétrons (ETR); **II** – Fluxo excessivo de luz (PE); **III** – Eficiência da dissipação não fotoquímica (ϕ_{NP}). NA – Plantas novas sem *B. subtilis*; NAB – Plantas novas assintomáticas com *B. subtilis*; NS – Plantas novas sintomáticas sem *B. subtilis*; NSB – Plantas novas sintomáticas com *B. subtilis*; VA – Plantas velhas sem *B. subtilis*; VAB – Plantas velhas com *B. subtilis*; VS – Plantas velhas sem *B. subtilis*; VSB – Plantas velhas sintomáticas com *B. subtilis*. As diferentes letras sobre cada condição indicam a existência de diferenças significativas ($p < 0,05$) entre estas, de acordo com o teste de Tukey HSD (one way ANOVA), e as barras de erro indicam o desvio padrão. 53

Figura 27 – Avaliação das trocas gasosas em folhas de *A. deliciosa* cv. “Hayward”: **I** – Transpiração (E) em mol por metro quadrado por segundo; **II** – Condutância estomática (gs) em mol por metro quadrado por segundo; **III** – Taxa de assimilação de CO₂ (A) em mol por metro quadrado por segundo; **IV** – Eficiência intrínseca do uso da água (A/gs). NA – Plantas novas sem *B. subtilis*; NAB – Plantas novas assintomáticas com *B. subtilis*; NS – Plantas novas sintomáticas sem *B. subtilis*; NSB – Plantas novas sintomáticas com *B. subtilis*; VA – Plantas velhas sem *B. subtilis*; VAB – Plantas velhas com *B. subtilis*; VS – Plantas velhas sem *B. subtilis*; VSB – Plantas velhas sintomáticas com *B. subtilis*. As diferentes letras sobre cada condição indicam a existência de diferenças significativas ($p < 0,05$) entre estas, de acordo com o teste de Tukey HSD (one way ANOVA), e as barras de erro indicam o desvio padrão. 54

Figura 28 – **I** – Razão fração molar de CO₂ intercelular/ fração molar de CO₂ ambiente em folhas de *A. deliciosa* cv. “Hayward”. As diferentes letras sobre cada condição indicam a existência de diferenças significativas ($p < 0,05$) entre estas. NA – Plantas novas sem *B. subtilis*; NAB – Plantas novas assintomáticas com *B. subtilis*; NS – Plantas novas sintomáticas sem *B. subtilis*; NSB – Plantas novas sintomáticas com *B. subtilis*; VA – Plantas velhas sem *B. subtilis*; VAB – Plantas velhas com *B. subtilis*; VS – Plantas velhas sem *B. subtilis*; VSB – Plantas velhas sintomáticas com *B. subtilis*. As diferentes letras sobre cada condição indicam a existência de diferenças significativas ($p < 0,05$) entre estas, de acordo com o teste de Tukey HSD (one way ANOVA), e as barras de erro indicam o desvio padrão. 55

Figura 29 – **I** - Quantificação da RuBisCo em folhas de *A. deliciosa* cv. “Hayward”. As diferentes letras sobre cada condição indicam a existência de diferenças significativas

($p < 0,05$) entre estas. NA – Plantas novas sem *B. subtilis*; NAB – Plantas novas assintomáticas com *B. subtilis*; NS – Plantas novas sintomáticas sem *B. subtilis*; NSB – Plantas novas sintomáticas com *B. subtilis*; VA – Plantas velhas sem *B. subtilis*; VAB – Plantas velhas com *B. subtilis*; VS – Plantas velhas sem *B. subtilis*; VSB – Plantas velhas sintomáticas com *B. subtilis*. As diferentes letras sobre cada condição indicam a existência de diferenças significativas ($p < 0,05$) entre estas, de acordo com o teste de Tukey HSD (one way ANOVA), e as barras de erro indicam o desvio padrão. 55

Figura 30 – I - Quantificação de açúcares totais em folhas de *A. deliciosa* cv. “Hayward”. NA – Plantas novas sem *B. subtilis*; NAB – Plantas novas assintomáticas com *B. subtilis*; NS – Plantas novas sintomáticas sem *B. subtilis*; NSB – Plantas novas sintomáticas com *B. subtilis*; VA – Plantas velhas sem *B. subtilis*; VAB – Plantas velhas com *B. subtilis*; VS – Plantas velhas sem *B. subtilis*; VSB – Plantas velhas sintomáticas com *B. subtilis*. As diferentes letras sobre cada condição indicam a existência de diferenças significativas ($p < 0,05$) entre estas, de acordo com o teste de Tukey HSD (one way ANOVA), e as barras de erro indicam o desvio padrão. 56

Figura 31 – I - Quantificação de Amido em folhas de *A. deliciosa* cv. “Hayward”. NA – Plantas novas sem *B. subtilis*; NAB – Plantas novas assintomáticas com *B. subtilis*; NS – Plantas novas sintomáticas sem *B. subtilis*; NSB – Plantas novas sintomáticas com *B. subtilis*; VA – Plantas velhas sem *B. subtilis*; VAB – Plantas velhas com *B. subtilis*; VS – Plantas velhas sem *B. subtilis*; VSB – Plantas velhas sintomáticas com *B. subtilis*. As diferentes letras sobre cada condição indicam a existência de diferenças significativas ($p < 0,05$) entre estas, de acordo com o teste de Tukey HSD (one way ANOVA), e as barras de erro indicam o desvio padrão. 57

Lista de Quadros

Quadro 1 – Composição média do kiwi de polpa verde. Valores expressos em 100g por parte comestível.....	6
Quadro 2 – Principais pragas que afetam a actinídea.	9
Quadro 3 – Principais fungos, bactérias e vírus que afetam a actinídea.	10
Quadro 4 – Diferenças na produção de faseolotoxina, Coronatina e proteínas efetoras (hopA ₁ , hopO ₁ e hopZ ₅) nas diferentes biovars de <i>Psa</i> . n.d. – não determinado; pfm - <i>P. syringae</i> pv. <i>actinidifoliorum</i>	15
Quadro 5 – Calendarização das operações culturais realizadas no pomar em 2017 (Vaz, 2017).....	36
Quadro 6 – Parâmetros qualitativos dos frutos avaliados em 2017. As diferentes letras sobre cada condição indicam a existência de diferenças significativas ($p<0,05$) entre estas, de acordo com o teste de teste t.....	57
Quadro 6 – (Continuação) – Parâmetros qualitativos dos frutos avaliados em 2017. As diferentes letras sobre cada condição indicam a existência de diferenças significativas ($p<0,05$) entre estas, de acordo com o teste de teste t.	58

1 Introdução

1.1 A cultura da actinídea

O género *Actinidia* pertence à família Actinidiaceae, ordem Ericales, classe Magnoliopsida e à divisão Magnoliophyta (ITIS, 2018; NCBI, 2018), estando identificadas cerca de 54 espécies e 21 variedades no género *Actinidia* (Li *et al.*, 2007).

A primeira descrição conhecida de actinídea, foi realizada através de um poema de Cen Sen (714 – 770 d. C.), no período da dinastia Tang (618 – 907 d. C.), que descreve um caramanchão ou uma treliça de actinídea sobre um poço num jardim (Yan, 1981; Huang *et al.*, 2007). Na China, a actinídea cresce na sua forma natural há vários séculos, tendo sido apelidada na dinastia Tang de *mihoutao* ou “pêssego do macaco” (monkey peach) pois os macacos tinham um gosto particular por estas frutas (Sharma *et al.*, 2009).

Mais tarde, na dinastia Song, século XII, é possível encontrar uma descrição mais pormenorizada da planta e do fruto, indicando que a planta tinha folhas redondas e pilosas e que crescia trepando pelas árvores. O fruto, que fazia lembrar um ovo, tinha pele castanha, e depois das primeiras geadas, tornava-se doce e comestível. Os relatos mais antigos fora da China reportam ao século XVIII pelo botânico escocês Robert Fortune que trouxe da China para a Europa os primeiros exemplares desta planta. Na época, o fruto não tinha interesse comercial, apenas despertava o interesse dos colecionadores (Courtney *et al.*, 2013).

O género *Actinidia* tem uma ampla distribuição geográfica que vai desde a linha equatorial até às regiões frias a 50° Norte, compreendido entre o Vale do Rio Yaluzangbujiang a Oeste até as Ilhas Japonesas a Este (Liang, 1993). Contudo, a maior parte das espécies e variedades encontram-se entre os 25° e os 30° Norte na China (Burdon e Lallu, 2011). A espécie *Actinidia deliciosa* distribui-se entre os 25° e os 45°, em ambos os hemisférios, tendo preferência por ambientes relativamente húmidos e abrigados, frios no Inverno (até -10 °C) e quentes no Verão (sem exceder os 40 °C), que tenham um período sem geadas suficientemente longo para permitir a maturação do fruto. Fora destas latitudes a produção está limitada pelo stress hídrico, pelos danos causados pela congelação durante o Inverno, abrolhamento precoce e pelas geadas de Outono e de Primavera (Ferguson, 2013).

As diversas cultivares de kiwi podem apresentar frutos de polpa verde, amarela ou vermelha. O kiwi de polpa verde detém uma posição dominante no mercado internacional devido à sua

boa capacidade de armazenamento e às características organoléticas, sendo o mercado dominado maioritariamente pela cultivar “Hayward”. As cultivares de polpa amarela como a “Hort16A” e Jintao têm vindo a crescer na Nova Zelândia e na China, respetivamente, atraindo cada vez mais consumidores dado que os frutos são mais doces e aromáticas que os da cultivar “Hayward”. Contudo as cultivares de polpa amarela não possuem uma grande capacidade de armazenamento o que se traduz em perdas consideráveis de fruta, mas, por outro lado tem um valor monetário de pelo menos 30% superior às cultivares de polpa verde (Huang *et al.*, 2012). Os frutos de polpa vermelha (a coloração avermelhada deve-se a presença de antocianinas, um pigmento único e natural que ocorre naturalmente dentro do fruto) foram colocada no mercado a 11 de maio de 2018 em Singapura por um período limitado de tempo (Zespri, 2018b).

Atualmente estão disponíveis no mercado diversas cultivares de Actinídia, para produção comercial de kiwi como a “Hayward”, “Bruno”, “Monty”, “Abbott”, “Elmwood”, “Fatma” e “Tere” (*A. deliciosa*) (Yildirim *et al.*, 2011), e actualmente as mais recentes “Earligreen[®]” e “Tsechelidis[®]” (Alves, 2016). Através da empresa Zespri[®] foram desenvolvidas as cultivaras “Hort16A” e “Zesy002” comercializadas como Zespri[®] Gold[™] e Zespri[®] SunGold[™] (*A. chinensis*) (Zespri, 2018a). O “baby kiwi” (*A. arguta*), após alguns anos sem grande relevância, é a terceira espécie de Actinídea em produção depois de *A. deliciosa* e *A. chinensis* (Huang *et al.*, 2007).

1.2 Caracterização morfológica

Todas as espécies do género Actinídea são plantas lenhosas trepadoras, muito variáveis nas suas estruturas vegetativas, apresentando variações nas folhas produzidas em diferentes alturas do ano, ou em ramos com diferentes anos de crescimento (Dunn, 1911; Li, 1952).

As folhas apresentam cor verde escura, com um pecíolo longo, de forma oval quase circular, com a base do limbo cordada, com um comprimento de 7,5-12,5 cm, e nervuras de cor clara. No estado juvenil as folhas possuem pêlos de cor vermelha. No estado adulto perdem a camada pilosa da face adaxial ficando com uma camada pilosa de cor branca na face abaxial (Saliyan *et al.*, 2017).

As raízes são fibrosas e carnudas, e os novos rebentos radiculares têm cor leitosa que com o tempo ficam com o córtex avermelhado, e a camada epidérmica torna-se castanha ou

castanha escura. A raiz principal é menos desenvolvida, cresce lentamente após o crescimento vigoroso das raízes laterais. (Huang, 2016).

Nas axilas das folhas podem existir 1 a 3 gomos cobertos por 3 a 5 camadas de escamas felpudas de cor amarelo-acastanhado. O gomo primário pode dar origem a folhas ou flores, e os dois secundários ficam no estado de dormência.

Sendo uma planta dióica apresenta flores masculinas e femininas em plantas separadas. As flores masculinas (Fig. 1) possuem vestígios de ovário e estiletes rodeados por uma espiral de estames viáveis para a produção de pólen (Harvey *et al.*, 1987). As flores femininas (Fig. 1) possuem um ovário largo, e estames que não são capazes de produzir pólen (Li *et al.*, 2007). Os botões florais surgem nas axilas das primeiras folhas dos rebentos anuais e as flores agrupam-se em inflorescências geralmente de três flores, contudo, em algumas cultivares como no caso da “Hayward” as duas flores laterais podem abortar. As flores podem ter 3-7 cm de diâmetro, com 5-7 pétalas de cor branca e 3-7 sépalas de cor acastanhada como se observa em *A. deliciosa* (García *et al.*, 2015).

Algumas cultivares são auto-férteis como a “Blake” (*A. Deliciosa*) e “Issai” (*A. Arguta*) (Strik *et al.*, 1998).



Figura 1 – Flores de *A. deliciosa* Flor masculina (à esquerda) e feminina (à direita). Foto do autor.

Os frutos podem variar na forma, sendo ovais, cilíndricos, arredondados e oblongos, com ou sem a presença de pêlos e com polpa de cor verde (Fig. 2), amarela ou vermelha. O peso varia entre os 20 a 70 gramas, sendo possível encontrar frutos com mais de 200 gramas (Huang, 2016).

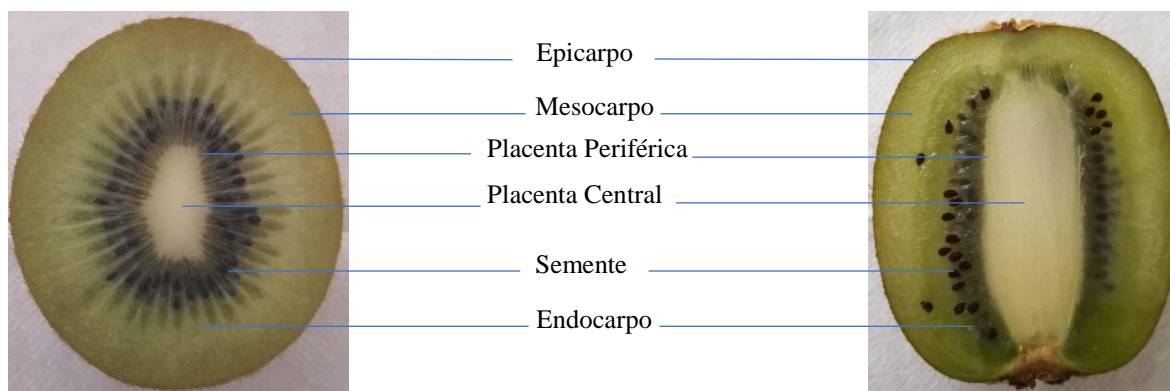


Figura 2 – Caracterização morfológica do kiwi, cv. “Hayward”. Adaptado de Guo *et al.*, 2013 e Huang, 2016. Fotos do autor.

A caracterização dos estados fenológicos da actinídea apresentados na Figura 3 é essencial, uma vez que determinam o período de intervenção do produtor para a execução e determinação de vários parâmetros e procedimentos essenciais à obtenção de frutos de qualidade, como a poda, tratamentos fitossanitários, aplicação de fertilizantes, monda de frutos, avaliação da maturação de frutos, entre outros (Salinero *et al.*, 2009).



A – Gomo de Inverno



B – Gomo de Inchado



C – Abrolhamento



D – Ponta Verde



E – Folhas visíveis



F – Botões florais visíveis

Figura 3 – Estados fenológicos da *A. deliciosa* cv. “Hayward”. Adaptado de: Salinero *et al.*, 1996; Oliveira, 2004; Salinero *et al.*, 2009. Fotos do autor.



G – Folhas separadas



H – Botões florais separados



H.1 – Separação das sépalas



H.2 – Pétalas visíveis



J – Fase Campânula



K – Floração



L - Vingamento



M – Crescimento dos Frutos



N – Maturação

Figura 3 – (Continuação) – Estados fenológicos da *A. deliciosa* cv. “Hayward”. Adaptado de: Salinero et al., 1996; Oliveira, 2004; Salinero et al., 2009. Fotos do autor.

1.3 Importância alimentar do kiwi

O kiwi é maioritariamente consumido em fresco, mas existem também diversos produtos processados como sumos, purés, doces, congelados, produtos desidratados e liofilizados, bebidas espirituosas e compotas (Guroo *et al.*, 2017).

O kiwi é uma fonte de minerais e fibra, sendo também uma excelente fonte de vitamina C (Quadro 1), sendo um fruto que durante o armazenamento a longo prazo em sistemas de refrigeração ou atmosfera controlada mantém as características de qualidade nutricional (Ferguson *et al.*, 2003).

Quadro 1 – Composição média do kiwi de polpa verde. Valores expressos em 100g de parte comestível.

Macronutrientes e energia	Kiwi	Vitaminas	Kiwi	Minerais	Kiwi
Água (g)	83,07	Vitamina C (mg)	92,7	Cálcio (mg)	34
Energia (Kcal)	61	Tiamina (mg)	0,027	Ferro (mg)	0,31
Proteínas (g)	1,14	Riboflavina (mg)	0,025	Magnésio (mg)	17
Lípidos (g)	0,52	Niacina (mg)	0,341	Fosforo (mg)	34
Hidratos de Carbono (g)	14,66	Vitamina B-6 (mg)	0,063	Potássio (mg)	312
Fibra (g)	3	Vitamina A (IU)	87	Sódio (mg)	3
Açúcar (g)	8,99	Vitamina E (mg)	1,46	Zinco (mg)	0,14

Fonte: USDA, 2018

Os benefícios para a saúde através do consumo regular de kiwi demonstraram melhorias não só no estado nutricional, mas também manifestaram benefícios na saúde digestiva, imunitária e metabólica. De particular interesse são os benefícios digestivos para indivíduos saudáveis e para quem sofra de distúrbios gastrointestinais, incluindo sintomas da síndrome do intestino irritável (Richardson *et al.*, 2018).

1.4 Importância económica da actinídea

O primeiro pomar comercial de *A. deliciosa* implementou-se na Nova Zelândia na década de 1930, sendo a produção para consumo local. A primeira exportação do fruto foi em 1953 com um grande sucesso nos mercados internacionais, que levou em 1970 a uma rápida expansão da área de produção com a finalidade de exportação (Ferguson, 2013).

A designação de Kiwi (Kiwifruit em inglês) surgiu em 1959 através da empresa Turners & Growers LTD, que foi uma das empresas pioneiras a exportar kiwi da Nova Zelândia para os Estados Unidos da América, alterando o nome comum até à data de groselhas chinesas (T&G Global, 2017). Esta alteração surgiu para evitar conotações negativas de "groselha", que na época não era particularmente popular, surgindo assim uma nova designação comercialmente viável (Lui, 2017).

Na década de 1990 ocorreu uma crise mundial no setor, devido à liberalização do mercado o que fez com que a rentabilidade da cultura tenha diminuído. Verificou-se uma redução da superfície plantada pelo défice de rentabilidade dos pomares, e também por erros cometidos na plantação que não permitiram superar a crise que se fazia sentir (APK, 2007). Todavia a trajetória de crescimento a longo prazo continuou, e a partir do ano 2000 houve um aumento significativo da área de plantação (Ward & Courtney, 2013). Tanto a nível mundial como europeu, a cultura da actínídea registou um aumento significativo a partir do ano 2000, superando a crise registada na década de 1990 que determinou uma redução da superfície ocupada pela cultura (Fig. 4 e 5).

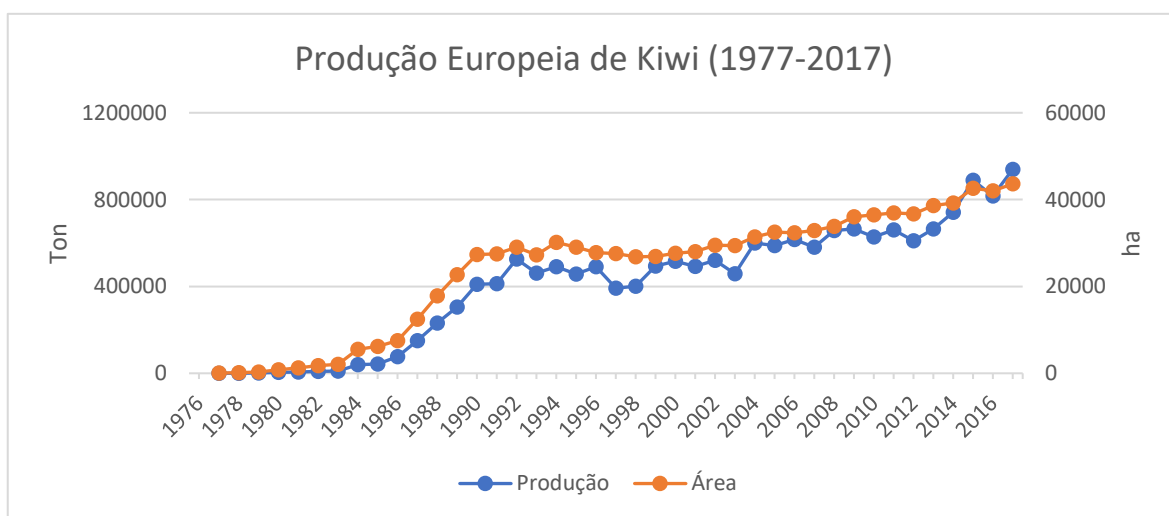


Figura 4 – Produção Europeia de kiwi entre 1977 e 2017. Fonte: FAOSTAT, 2019.

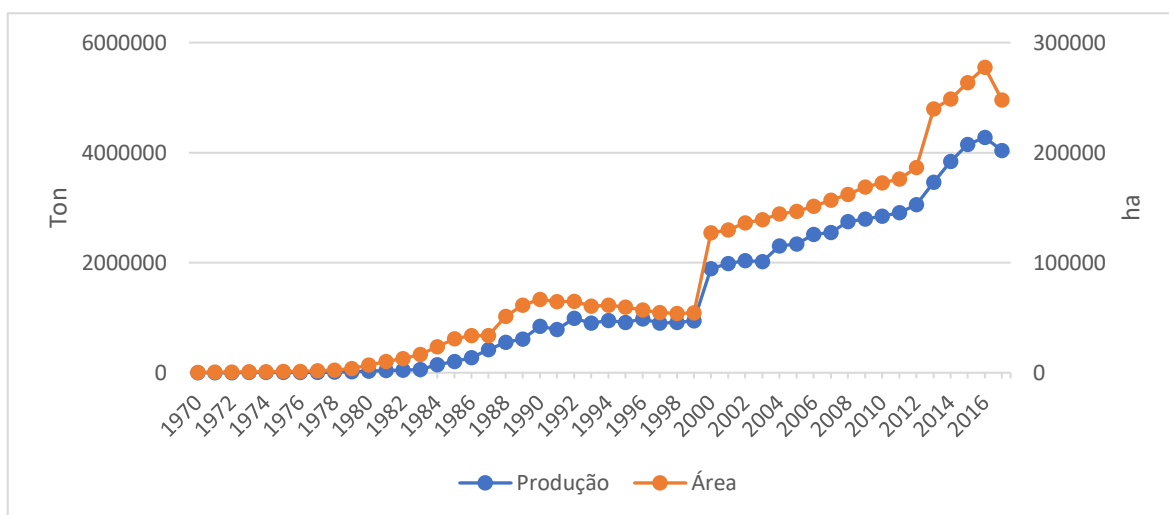


Figura 5 – Produção mundial de kiwi entre 1970 e 2017. Fonte: FAOSTAT, 2019.

Em Portugal a Actínídea foi introduzida no ano de 1973, sendo o primeiro pomar instalado em Vila Nova de Gaia pelo Dr. Ponciano Serrano (Martinho, 2006). Contudo, a cultura despertou um especial interesse a partir da década de 1990, em função dos bons preços

alcançados pelo fruto a nível de mercado, pelo potencial produtivo, baixo custo de produção e, ainda, por apresentar poucos problemas fitossanitários (Félix e Cavaco, 2004). A instalação de novos pomares cresceu de 1990 até 1992 e manteve-se estagnada até 2000, ano em que a área de produção recomeçou a crescer (Fig. 6).

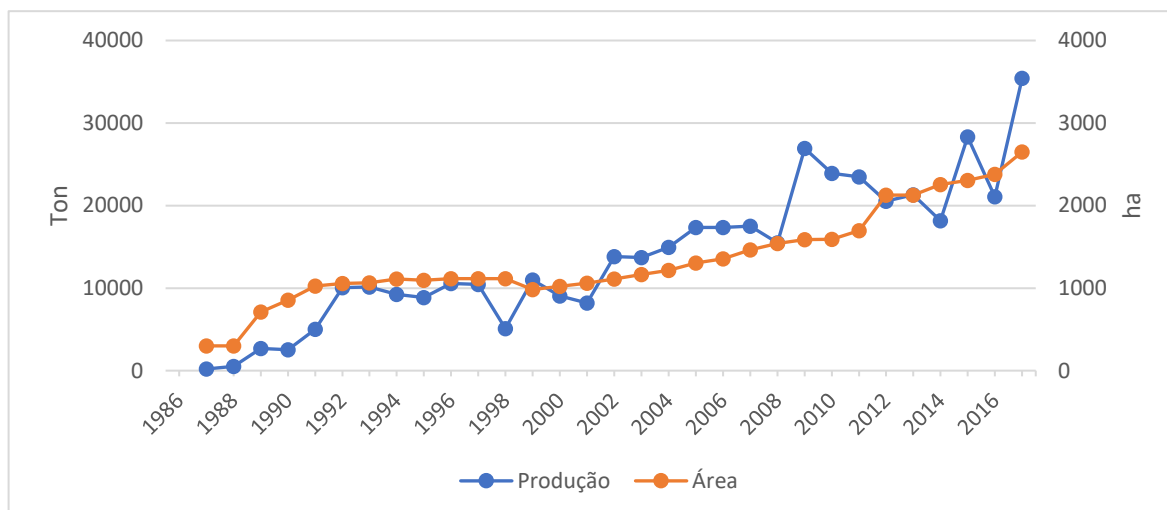


Figura 6 – Produção em Portugal de kiwi entre 1987 e 2017. Fonte: FAOSTAT, 2019.

Atualmente o principal país produtor de kiwi é a China, com 2,024 milhões de toneladas em 2017, seguindo-se a Itália e a Nova Zelândia com 541,15 e 411,78 mil toneladas, respetivamente (FAOSTAT, 2019). Em Portugal, o kiwi é produzido na Região Centro e no Norte, localizam-se a maior área de produção na região de Entre-Douro e Minho, onde a cultura encontra condições edafo-climáticas muito favoráveis para a obtenção de frutos de grande qualidade.

Em 2017 registou-se em Portugal uma produção que alcançou as 35,4 mil toneladas, a maior de sempre, resultado quer do aumento de produtividade face ao ano anterior, quer, sobretudo, da entrada em plena produção de pomares recentemente implantados (Fig.7) (INE, 2018).

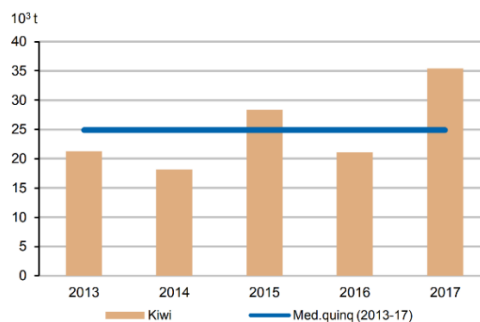


Figura 7 – Produção de kiwi em Portugal desde 2013 até 2017. Fonte: INE, 2018.

Em 2016 Portugal exportou 12000 toneladas o equivalente a 12,146 milhões de euros, e em 2017 exportou 16273 toneladas o equivalente a 19,486 milhões de euros, tendo sido na capítulo 8 de “Frutas; cascas de citrinos; melões” das Estatísticas Agrícolas a 7ª fruta mais exportada em 2017 e a 6ª em 2017 (INE, 2018).

1.5 Proteção fitossanitária e acidentes fisiológicos

1.5.1 Proteção fitossanitária

Existem várias pragas (Quadro 2) e doenças (Quadro 3) que podem afetar a cultura da actinídea, e que variam consoante a localização geográfica do pomar, podendo causar elevados ou baixos prejuízos na cultura, com maior ou menor impacto na indústria produtora (KVH, 2017).

Quadro 2 – Principais pragas que afetam a actinídea.

Espécies	Nome comum
<i>Haltica ampelophaga</i> Guer.	Áltica
<i>Ceratitis capitata</i> (Wiedemann)	Mosca do Mediterrâneo
<i>Bactrocera</i> (Daculus) <i>oleae</i> (Gmelin)	Mosca da Azeitona
<i>Aphis citricola</i> Patch	Afídeo verde
<i>Hemiberlesia insularis</i> (Balach.)	Cochonilha
<i>Pseudaulacaspis pentagona</i> (Targioni Tozzetti)	Cochonilha branca
<i>Empoasca vitis</i> (Göthe)	Cigarrinha verde
<i>Lobesia botrana</i> (Denis & Schiffermüller)	Traça da uva
<i>Archips podana</i> (Scopoli)	Traça
<i>Cacoecimorpha pronubana</i> (Hübner)	
<i>Pandemis heparana</i> (Denis & Schiffermüller)	
<i>Frankliniella schultzei</i> Trybom	Tripes
<i>Thrips australis</i> Bagnall	
<i>Heliothrips haemorrhoidalis</i> (Bouché)	
<i>Meloidogyne hapla</i> Chitwood	Nemátodes
<i>Meloidogyne javanica</i> (Treub) Chitwood	
<i>Meloidogyne incognita</i> (Kofoid & White)	
<i>Meloidogyne arenaria</i> (Neal) Chitwood	

Adaptado de: Félix *et al.*, 2008; Cacioppo, 1989; Carneiro *et al.*, 2004; Costa, 2008.

Quadro 3 – Principais fungos, bactérias e vírus que afetam a actinídea.

Nome científico	Nome comum
Fungos	
<i>Armillaria mellea</i> (Vahl) Kummer	Podridão agárica (Podridão Branca)
<i>Botritis cinera</i>	Podridão cinzenta
<i>Chondrostereum purpureum</i>	Doença do chumbo
<i>Fomitiporia mediterrânea</i>	
<i>Phaeoacremonium aleophilum</i>	
<i>Phaeoacremonium parasiticum</i>	“Esca do kiwi” (doença do lenho)
<i>Phaeomoniella chlamydospora</i>	
<i>Chondrostereum</i> sp.	
<i>Phytophthora</i> spp.	Podridão da raiz e do colo
Bactérias	
<i>Pseudomonas viridiflava</i>	Murchidão Bacteriana
<i>Pectobacterium carotovorum</i> subsp. <i>actinidiae</i>	Cancro bacteriano (de Verão)
<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>syringae</i>	Necrose dos botões
<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>actinidiae</i>	Cancro bacteriano (Psa)
<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>actinidifoliorum</i>	Manchas foliares
Víruses	
<i>Pelargonium zonate spot virus</i> (PZSV)	
<i>Cherry Leaf Roll Virus</i> (CLRV)	

Adaptado de: Di Marco *et al.*, 2000; Sofia, 2003; Di Marco *et al.*, 2004; Ramsfield, 2006; Cuntly *et al.*, 2015; KVH, 2017).

1.5.2 Acidentes fisiológicos

Calor

Nos períodos de maior calor podem verificar-se danos nas plantas ao nível das folhas e dos frutos, e este fenómeno pode provocar a queda do pelo dos frutos a partir do epicarpo. O calor excessivo com baixo teor de humidade (<60%) afeta a formação de gomos, e consequentemente, afeta a produção do ano seguinte, levando também a que os frutos não se desenvolvam adequadamente. (Cacioppo, 1989).

Geadas

A geada é o acidente climático que mais estragos pode causar num pomar, podendo em casos extremos, provocar a perda total da produção. O seu efeito manifesta-se quer nas plantas, quer no fruto. Durante a fase de repouso vegetativo as geadas não constituem um fator de

risco. De outro modo, as geadas primaveris ocorrem quando a rebentação já foi iniciada, e podem ocasionar estragos mais significativos, tais como, lesões ao longo do tronco nas plantas jovens, ligeiras necroses nas folhas de plantas adultas, ou podendo mesmo levar à destruição parcial ou total da parte aérea da planta, comprometendo a produção final. As geadas outonais precoces têm efeito negativo nos frutos, causando necroses no pedúnculo e levando à queda dos frutos, bem como à destruição celular que leva a uma rápida perda de dureza da polpa, tornando os frutos impróprios para o armazenamento (Oliveira *et al.*, 2008).

Granizo

O granizo pode ocorrer em qualquer altura do ano. Na Primavera afeta jovens rebentos herbáceos e os botões florais, podendo provocar uma perda significativa da produção. Pode conduzir a uma maior percentagem de aborto floral, menor desenvolvimento dos frutos e menor número de varas para garantir a produção do ano seguinte. Na época de Verão os frutos pouco ou nada sofrem com o granizo, devido à abundância foliar, e os estragos são mais ligeiros (Oliveira *et al.*, 2008).

Vento

Durante a Primavera, a ação do vento pode quebrar os jovens ramos frutíferos e diminuir assim a produção desse ano, podendo afetar os jovens rebentos que garantem a produção do ano seguinte. Quando o vento incide com persistência sobre os frutos que não estejam suficientemente protegidos, pode causar manchas e deformações que originam depreciação comercial, sendo a cultivar “Hayward” mais suscetível a este fator (Cacioppo, 1989).

1.6 Cancro bacteriano da actinídea

1.6.1 História e distribuição geográfica da doença

Pseudomonas syringae pv. *actinidiae* (Psa) a bactéria responsável pela doença do cancro bacteriano da actinídea, foi isolada pela primeira vez no Japão em 1984 (Takikawa *et al.*, 1989; Serizawa *et al.*, 1989). Mais tarde, em 1989 foi descrita na China uma doença semelhante (Butler *et al.*, 2013). Na Europa o primeiro foco de Psa foi detetado em Itália, na região de Latina, em 1992 (Scortichini, 1994), e o primeiro surto epidémico causado pela biovar 3 ou Psa3, a forma pandémica e de elevada virulência de Psa, ocorreu em 2008 no centro e no norte de Itália (Balestra *et al.*, 2009; Vanneste *et al.*, 2013) causando perdas

económicas significativas na indústria produtora de kiwi (Scortichini *et al.*, 2012; Vanneste, 2017).

Desde 2008 a doença dispersou-se pelas regiões produtoras de kiwi (Fig. 8), estando oficialmente presente na China (Zhongsu *et al.*, 1992), Coreia do Sul e Irão (Mazarei e Mostofipour, 1994) Portugal (Balestra *et al.*, 2010), França (Vanneste *et al.*, 2011a), Espanha (Abelleira *et al.*, 2011), Suíça (EPPO, 2011a), Austrália (EPPO, 2011b), Chile (EPPO, 2011), Nova Zelândia (Everett *et al.*, 2011), Turquia (Bastas & Karakaya, 2012), Alemanha (EPPO, 2013), Eslovénia (Dreo *et al.*, 2014), Grécia (Holeva *et al.*, 2015) e mais recentemente na Argentina (Balestra *et al.*, 2018).

Devido à sua perigosidade e pelo facto de não existirem meios de luta eficazes contra a bactéria, desde 2012 Psa foi incluída na lista A2 da EPPO (European and Mediterranean Plant Protection Organization) que inclui vários organismos de quarentena (EPPO, 2018a).

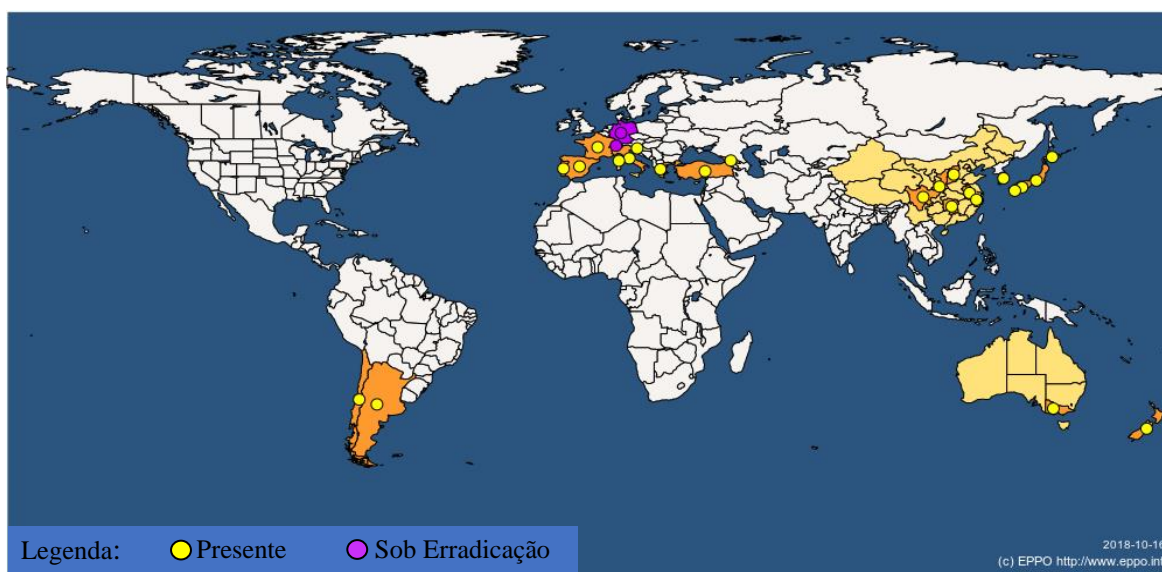


Figura 8 – Mapa de distribuição de *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* em maio de 2018. Fonte: EPPO, 2018b.

A origem e evolução do cancro bacteriano da actinídea não está ainda totalmente clarificado e continua a ser objeto de múltiplos e diversos estudos. Pensa-se que devido ao facto da actinídea ter o seu centro de origem na Ásia, Psa possa também ter origem na mesma região geográfica (Marcelletti *et al.*, 2011). Os trabalhos de Butler *et al.* (2013) e McCann *et al.* (2013) sugeriram que a China podia ser a origem do mais recente surto global de Psa. Embora as estirpes de Psa estudadas naquela época não tenham disponibilizado provas inequívocas e bem fundamentadas de uma origem chinesa, esta especulação foi baseada no

fato de que: os kiwis são nativos da China; é a zona de proveniência do material vegetal selecionado para fins comerciais e para melhoramento de novas cultivares na China, Nova Zelândia, Itália e outras regiões produtoras de kiwi; existe grande comércio internacional de material vegetal entre todas essas regiões; e foi verificado que um isolado chinês transportava um elemento integrativo e conjugativo (ICE) que também foi encontrado na Nova Zelândia em isolados de Psa3 (Butler *et al.* 2013).

A sequenciação do genoma completo de Psa mostrou o mais recente surto de doença foi causado por um novo grupo de Psa3, enquanto incidentes da doença anteriores no Japão e na Coreia foram causados por estirpes que formam agrupamentos separados de Psa1 e Psa2 respetivamente (Marcelletti *et al.*, 2011; Mazzaglia *et al.*, 2012; Butler *et al.*, 2013; McCann *et al.*, 2013). Estes agrupamentos são marcados por variação substancial nos efetores de segregação do tipo III, que são necessários para virulência em *P. syringae*. Apesar do nível surpreendente de diferenças intra-patovar existem vários genes de virulência que ocorrem após a divergência destes três agrupamentos, sendo as estirpes de cada agrupamento capazes de infectar e crescer a níveis elevados quer em *A. chinensis* var. *deliciosa* quer em *A. chinensis* var. *chinensis* (McCann *et al.*, 2013).

A análise genómica de estirpes de Psa3 que causaram o surto mundial, revelaram que pertence à mesma linhagem originária da China (Butler *et al.*, 2013; McCann *et al.*, 2013).

Segundo Marcelletti *et al.* (2011) a população de Psa 3 que estava presente em Itália desde 2008 não deverá descender da população Psa1 que já estava presente no país desde 1992, contudo, referem estes autores que estas duas populações terão evoluído a partir de um ancestral comum. Mais recentemente, McCann *et al.* (2017) descreveram uma população endémica de Psa infectando kiwis cultivados na China. Todos os isolados de Psa na China são membros do grupo Psa3. Estes autores referem que as estirpes pandémicas isoladas na Itália, Portugal, Chile e Nova Zelândia são derivados de uma única linhagem dentro deste agrupamento, juntamente com um subconjunto de isolados chineses, indicando que em última análise, a pandemia, surgiu a partir da população chinesa diversificada do agrupamento de estirpes Psa3. As estirpes italianas pandémicas compartilham um SNP com seis de nove estirpes Psa pandémicas chinesas, indicando que provavelmente houve um evento de transmissão direto da China para a Itália antes de 2008.

Um estudo demonstra que o patógeno não evoluiu a partir da população já presente em Itália, pensa-se que a dispersão e introdução noutros países terá sido devido à introdução de

material vegetal de propagação infetado em Itália e que, de forma latente tem contribuído em grande escala para a disseminação de Psa. A introdução de material infetado também foi implicado como a causa da ocorrência de cancro bacteriano da actinídea em França, Espanha, Portugal, Suíça e no Chile (Scortichini *et al.*, 2012).

A presença do patógeno no pólen já foi identificada em amostras provenientes de Itália e da Nova Zelândia em pomares afetados e não afetados por Psa. Não existe, no entanto, nenhuma evidência de que a polinização artificial leva ao aumento da infeção, ou que o pólen tenha sido responsável pela introdução de Psa numa área anteriormente livre de infeção (Vanneste *et al.*, 2011b). Recentemente, na Argentina foi detetada a presença de Psa no pólen de actinídea na época de colheita de pólen, mas não nas plantas, aspecto que exige uma grande atenção para o risco potencial de propagação do patógeno no futuro (Balestra *et al.*, 2018).

Para um maior controlo da disseminação da doença, a movimentação de plantas (importação/exportação e compras internas), carece obrigatoriamente de passaporte fitossanitário (Cunty *et al.*, 2014). A presença do passaporte indica que o material vegetal foi inspecionado, de acordo com os critérios estabelecidos na legislação em vigor, cumpre com os requisitos fitossanitários específicos e foi considerado isento dos organismos prejudiciais de quarentena (DGAV, 2018).

1.6.2 Taxonomia

A espécie fitopatogénica *P. syringae* compreende 57 patovares que afetam diferentes espécies de plantas em todo o mundo (Bull *et al.*, 2010), sendo *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* (Psa) responsável pelo cancro bacteriano da actinídea pertencente ao filo *Proteobacteria*, subdivisão *Gamma*, ordem *Pseudomonadales* e família *Pseudomonadaceae* (EPPO, 2014). Psa apresenta variabilidade genética, sendo conhecidas atualmente 5 populações com diferentes virulências, designadas biovar 1, 2, 3, 5, e 6 ou Psa1, 2, 3, 5 e 6 (Sawada *et al.*, 2014; Sawada *et al.*, 2016; Vanneste, 2017; Garcia *et al.*, 2018), presentes em diferentes países e continentes (Fig. 9).

A população 4, biovar 4 ou Psa 4, que apenas causava sintomas nas folhas (manchas foliares) e tinha baixa virulência (Scortichini *et al.*, 2012; Vanneste *et al.*, 2013; Cunty *et al.*, 2014) não causando a morte das plantas nem causando perdas económicas importantes (Vanneste, 2013), e que apresentava características genéticas e fenotípicas distintas das restantes biovars, foi reclassificada por Cunty *et al.* (2015) como uma nova patovar, a que se atribuiu

a designação de *Pseudomonas syringae* pv. *actinidifoliorum* (Pfm). Esta nova patovar foi descrita recentemente em *A. deliciosa* e *A. chinensis* na Austrália, França, Nova Zelândia e Espanha (Abelleira *et al.*, 2015; Cuntly *et al.*, 2015; EPPO, 2016; Vanneste *et al.*, 2017).

As diferentes biovars de Psa (Quadro 4), apresentam diferenças na sequência de DNA (ADN - Ácido Desoxirribonucleico) de vários genes, na produção de toxinas (faseolotoxina e coronatina), e em proteínas efetoras (Quadro 4) (EPPO, 2014; Che *et al.*, 2018).

Quadro 4 – Diferenças na produção de faseolotoxina, Coronatina e proteínas efetoras (hopA₁, hopO₁ e hopZ₅) nas diferentes biovars de *Psa*. n.d. – não determinado; pfm - *P. syringae* pv. *actinidifoliorum*.

Terminologia corrente	Faseolotoxina	Coronatina	hopA ₁	hopO ₁	hopZ ₅
<i>Psa</i> biovar 1	+	-	-	-	-
<i>Psa</i> biovar 2	-	+	+	-	-
<i>Psa</i> biovar 3	-	-	+/-	-	+
Pfm	-	-	+	+	-
<i>Psa</i> biovar 5	-	-	+	-	-
<i>Psa</i> biovar 6	+	+	n.d	n.d	-

Fonte: Adaptado de Vanneste, 2017.

As estirpes pertencentes à população Psa1, isoladas no Japão e em Itália antes de 2008, são caracterizadas por produzirem faseolotoxina e não produzirem coronatina (Chapman *et al.*, 2012). Apesar da proximidade genética encontrada nas estirpes isoladas nestes dois locais a virulência parece variar com a localização geográfica, uma vez que, no Japão causou importantes perdas económicas ao contrário do que aconteceu em Itália, onde não provocou grande impacto na produção de kiwi. Este comportamento diversificado sugere que os padrões climáticos e/ou as técnicas de produção podem desempenhar um papel fundamental na virulência para o mesmo agente patogénico (Scortichini *et al.*, 2012).

As estirpes da biovar 2 foram isoladas pela primeira vez na Coreia na década de 1980 em *A. chinensis* var. *deliciosa* e a segunda vez em 2006 em *A. chinensis* var. *chinensis* (Ruinelli *et al.*, 2016). Caracterizam-se por produzir coronatina e não faseolotoxina (Han *et al.*, 2003) e são geneticamente próxima da biovar 5 (Cameron & Sarojini, 2014; Fujikawa & Sawada, 2016).

A biovar 3 (Vanneste *et al.*, 2013) ou *Psa*-V (para virulenta) (Chapman *et al.*, 2012), é responsável pela crise pandémica de 2008 que se espalhou pelas regiões produtoras de kiwi

(*A. deliciosa* e *A. chinensis*) (Gallelli *et al.*, 2014). A biovar 3 ou Psa3 não produz coronatina nem faseolotoxina (Scortichini *et al.*, 2012) e é considerada responsável pelas maiores perdas económicas, nos países produtores de kiwi, incluindo entre outros, Itália, Nova Zelândia e Portugal (Balestra *et al.*, 2009; Scortichini *et al.*, 2012; Cuntty *et al.*, 2015; Vanneste, 2017; Garcia *et al.*, 2018).

A biovar 5 foi isolada em *A. chinensis* apenas no Japão, Prefeitura de Saga, (Sawada *et al.*, 2014) e está proximamente relacionada com a biovar 2, apesar de não ter capacidade de produzir a toxina coronatina (Fujikawa e Sawada, 2016).

Por fim, a biovar 6 foi isolada em *A. deliciosa* cv. “Hayward” no Japão, na Prefeitura de Nagano, e as estirpes produzem as duas fitotoxinas, faseolotoxina e coronatina. Está muito limitada em termos de dispersão, e poderá ter um importante contributo para se tentar perceber a origem e evolução de Psa (Sawada *et al.*, 2016).

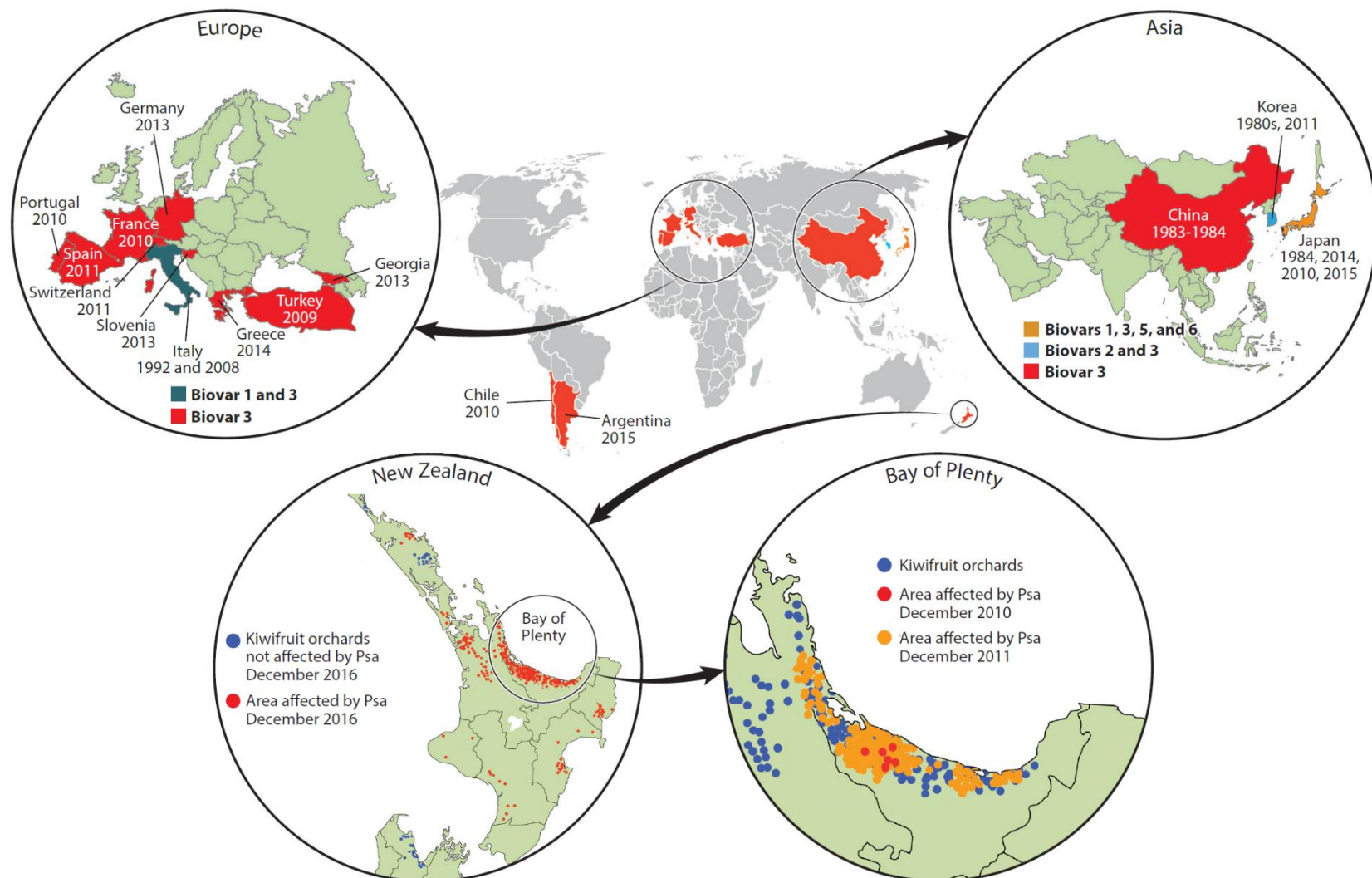


Figura 9 – Distribuição geográfica dos diferentes tipos de biovars de *Psa*. (Vanneste, 2017)

1.6.3 Caracterização morfológica e cultural

As bactérias do género *Pseudomonas* são bacilos reto ou ligeiramente curvos gram-negativo, com uma dimensão de 0,5-1,0 x 5,0 µm, podendo ter um ou mais flagelos polares (Palleroni, 2005). *Psa* (Fig. 10) caracteriza-se por ser aeróbia, oxidase negativa, dihidrolase da arginina negativa, pectina negativa, levana positiva e apresenta reação de hipersensibilidade positiva em folhas de tabaco, estando incluída no grupo LOPAT Ia (Lelliott *et al.*, 1966).

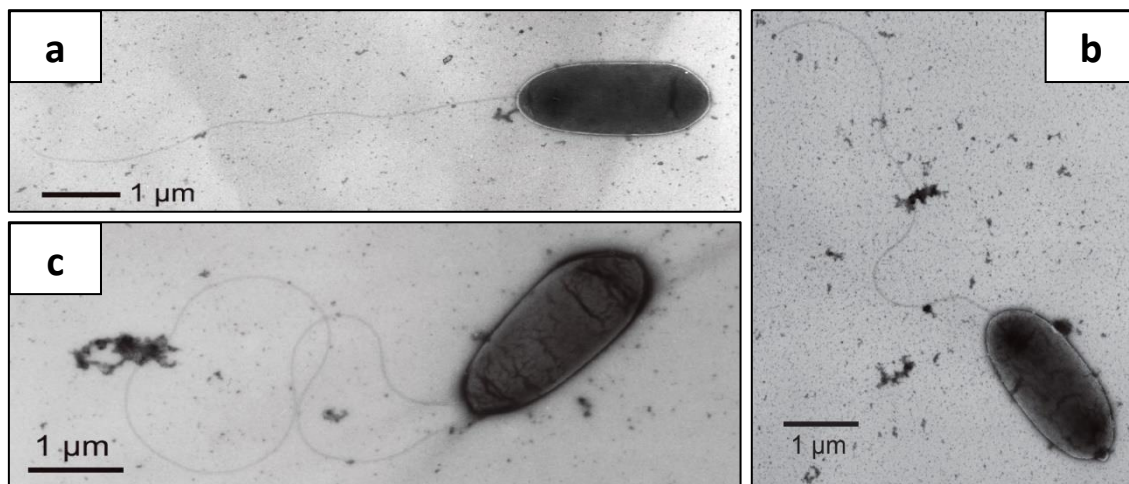


Figura 10 – Morfologia de três biovars de *Psa* através de microscopia eletrónica. **a)** – *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* biovar 3, com dimensão de $2,4 \pm 0,3 \mu\text{m} \times 1,1 \pm 0,05 \mu\text{m}$ (Sawada *et al.*, 2015); **b)** – *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* biovar 5, com $2,5 \pm 0,4 \mu\text{m} \times 0,9 \pm 0,1 \mu\text{m}$ (Sawada *et al.*, 2014); **c)** – *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* biovar 6, com dimensão de $2,5 \pm 0,5 \mu\text{m} \times 1,2 \pm 0,1 \mu\text{m}$ (Sawada *et al.*, 2016).

As colónias (Fig. 11) obtidas em meio B de king (King *et al.*, 1954), são de uma cor esbranquiçada, translúcidas e redondas (Takikawa *et al.*, 1989; Everett *et al.*, 2011; Abelleira *et al.*, 2014). Ao nível da fluorescência em meio B de King, há autores que referem que *Psa* não apresenta fluorescência quando observada sob luz ultravioleta (Takikawa *et al.*, 1989; Mazzaglia *et al.*, 2011; Yan *et al.*, 2013) e outros referem que as colónias apresentam fluorescência, como no caso das estirpes isoladas em 2009 em Itália e em 2010 em França (Ferrante *et al.*, 2010; Vanneste *et al.*, 2011c).

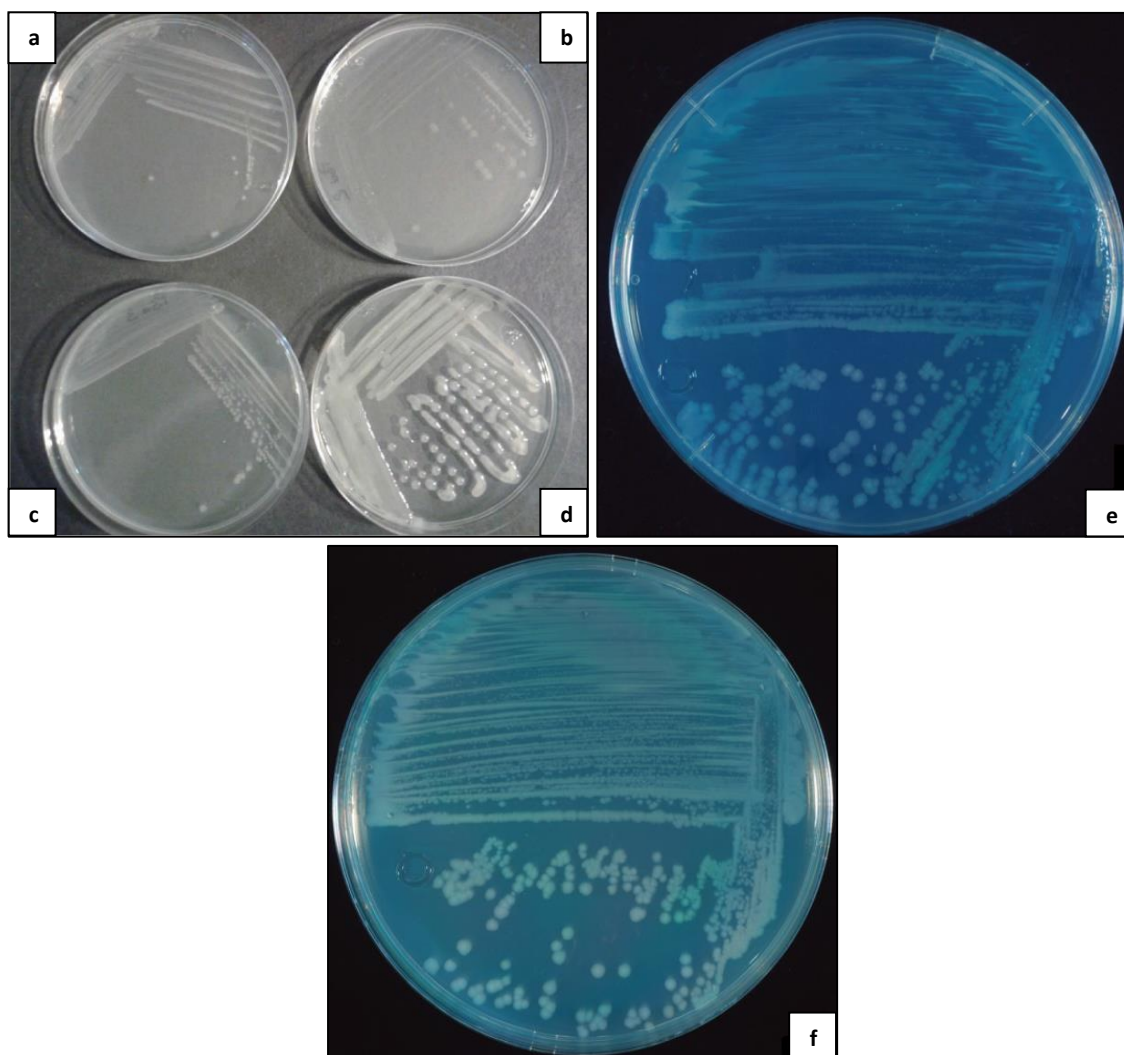


Figura 11 – Exemplos de diferentes colonias de *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae*. Culturas obtidas em meio de agar nutritivo suplementado com sacarose 3% (NSA) incubado a 23-25°C durante 72 horas, **a)** - Psa biovar 1; **b)** - Psa biovar 2; **c)** - Psa biovar 3; **d)** - Psa biovar 4 (Ferrante & Scortichini 2015); **e)** - Psa biovar 5, cultura obtida em agar padrão (Standard Methods Agar) incubada durante 72h a 27 °C (Sawanda *et al.*, 2014); **f)** - Psa biovar 6, cultura obtida em agar padrão (Standard Methods Agar) incubada durante 72 h a 27 °C (Sawanda *et al.*, 2016).

1.6.4 Sintomatologia

A sintomatologia do cancro bacteriano da actinídea varia de acordo com a época do ano, apresentado sintomas nos troncos, ramos, folhas, botões florais e flores. O sintoma que mais se destaca na altura da Primavera é a produção de exsudados associado a cancrs e feridas nos troncos e ramos infetados, e também pode ser observada uma coloração vermelha-acastanhada por baixo do córtex (Fig. 12 a). Pode ainda ocorrer uma produção de exsudados bacterianos brancos ou avermelhados nos tecidos infetados após um período de intensa

multiplicação bacteriana, podendo observar-se antes da floração e no Verão (Fig. 12 b) (Vanneste *et al.*, 2011d; Abelleira *et al.*, 2011)

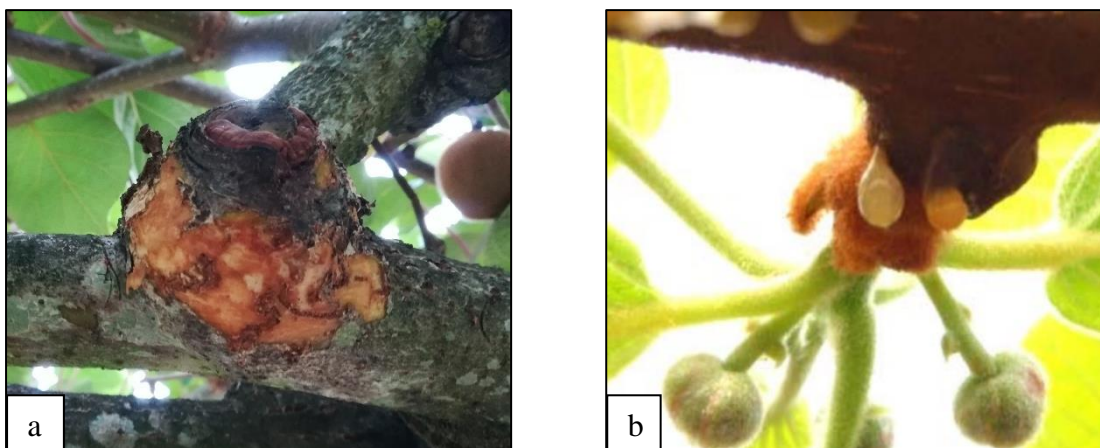


Figura 12 – a) Coloração avermelha por baixo do córtex, *A. deliciosa* cv. “Hayward” (Foto do autor); b) produção de exsudados esbranquiçados na altura da floração (Vanneste, 2010).

Na Primavera e Verão e Outono podem surgir nas folhas pontuações necróticas de coloração acastanhada rodeadas ou não por um halo clorótico (Fig. 13) , encontrando-se este sintoma principalmente nas folhas mais jovens, que poderá estar associado à murchidão das folhas (Vanneste *et al.* 2011d). Estas manchas necróticas podem acabar por se juntar, formando necroses castanhas com uma maior dimensão (Moura, 2013). A origem desta murchidão apenas ocorre quando a bactéria se movimenta sistemicamente dentro dos tecidos da planta provocando o bloqueamento dos tecidos vasculares (Vanneste *et al.*, 2011d; Huang, 2016).

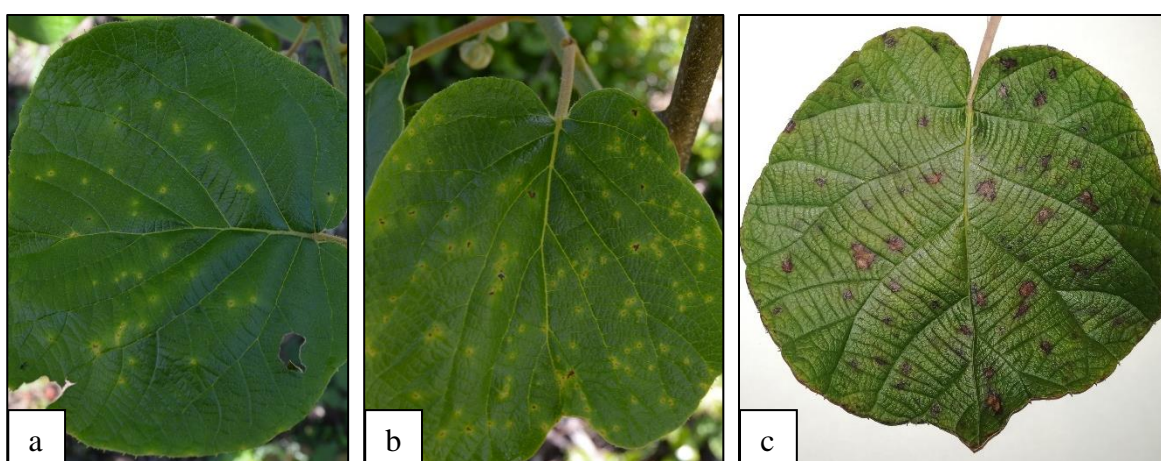


Figura 13 – Evolução das pontuações necróticas em duas fases do ano, *A. deliciosa* cv. “Hayward”. a) e b) fotografias recolhidas a 1 de maio de 2018; c) fotografia recolhida a 18 de outubro. Fotos do autor.

Os jovens rebentos de ramos infetados poderão murchar (Fig. 14) manifestando-se esta sintomatologia no sentido da extremidade do ramo para a zona de inserção no tronco, devidopossivelmente à progressão da bactéria no sistema vascular da planta (Vanneste *et al.*, 2011d).



Figura 14 – Murchidão dos rebentos, em *A. deliciosa* cv. “Hayward”, infetados com Psa. Fotos do autor.

Ao nível dos botões florais podem surgir necroses (Fig. 15) que provocaram a sua murchidão, que levam à sua queda ou abortamento floral, impedindo a formação do fruto (Vanneste *et al.*, 2011d; Abelleira *et al.*, 2011; Moura, 2013).

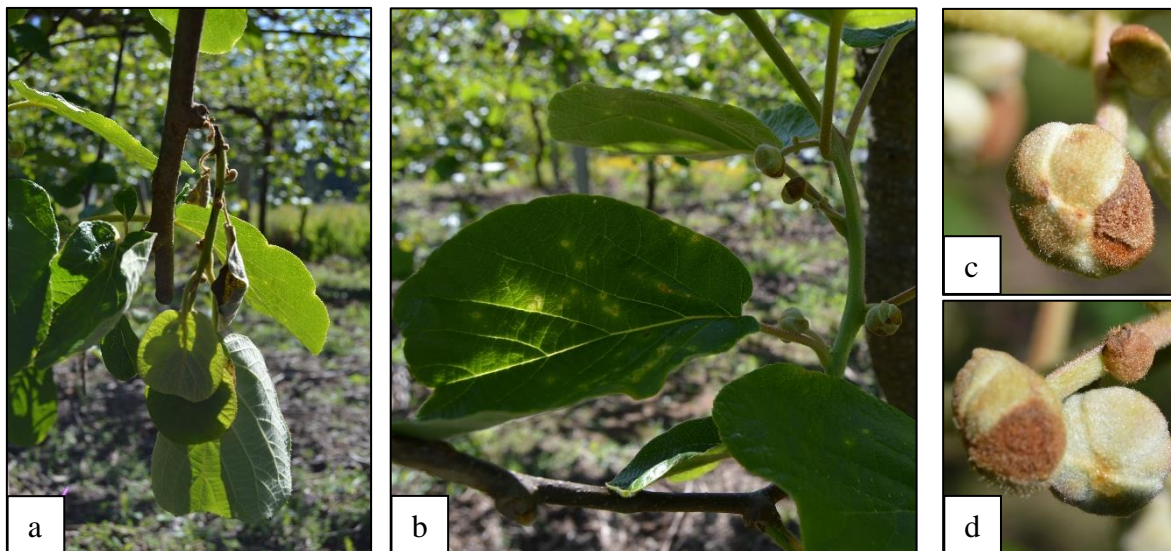


Figura 15 – Necroses nos botões florais, *A. deliciosa* cv. “Hayward”, em diferentes contextos. **a)** Murchidão de um lançamento com botões florais necrosados; **b)** Lançamento do ano com folhas sintomáticas de pontuações necróticas e botões florais necrosados; **c)** e **d)** Botões florais necrosados. Fotos do Autor.

No final do Verão e durante o Outono é possível observar-se em alguns casos a formação de cancrios nos troncos e nos ramos, podendo mais tarde a bactéria infetar a planta através das diversas feridas provocadas após a colheita dos frutos e da queda das folhas. Contudo os sintomas resultantes de novas infeções apenas surgem e manifestam a presença de Psa na Primavera seguinte (Vanneste *et al.*, 2011d).

No Inverno os sintomas apenas se verificam no final da estação, sendo possível observar cancrios nos troncos, ocorrendo a libertação de exsudados bacterianos esbranquiçados ou avermelhados (Fig. 16) que podem constituir uma grande fonte de inóculo da bactéria (Everett *et al.*, 2011).

Existem sintomas que podem causar dúvidas relativamente á identificação de Psa em campo, pela semelhança de sintomas com os de outras bactérias patogénicas que também são capazes de infetar a actínídea. A morfologia das pontuações necróticas apresentadas nas folhas e as necroses observadas nos botões florais são idênticos aos observados pela infeção das bactérias *P. syringae* pv. *syringae* ou *P. viridiflava*, pelo que torna dúbia a sua identificação em campo. Dos sintomas mais característicos de Psa é a produção de exsudados brancos e avermelhados e a morte das plantas (Vanneste *et al.*, 2011d).

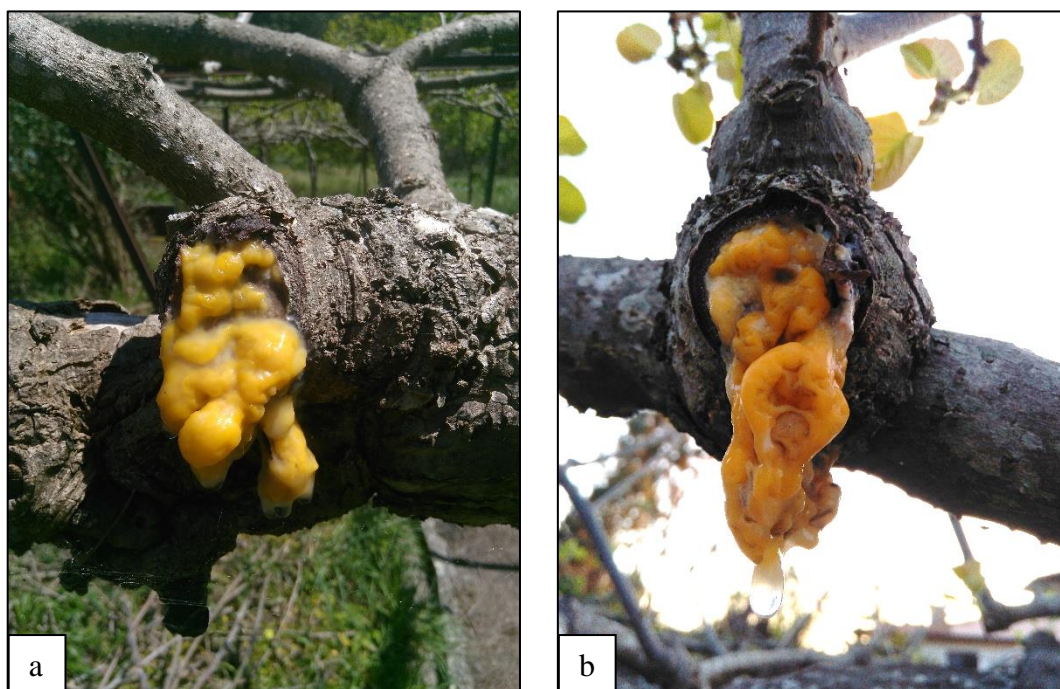


Figura 16 – Produção de exsudados em *A. deliciosa* cv. “Hayward”. a) e b) Produção de exsudados amarelados. Fotos do Autor.

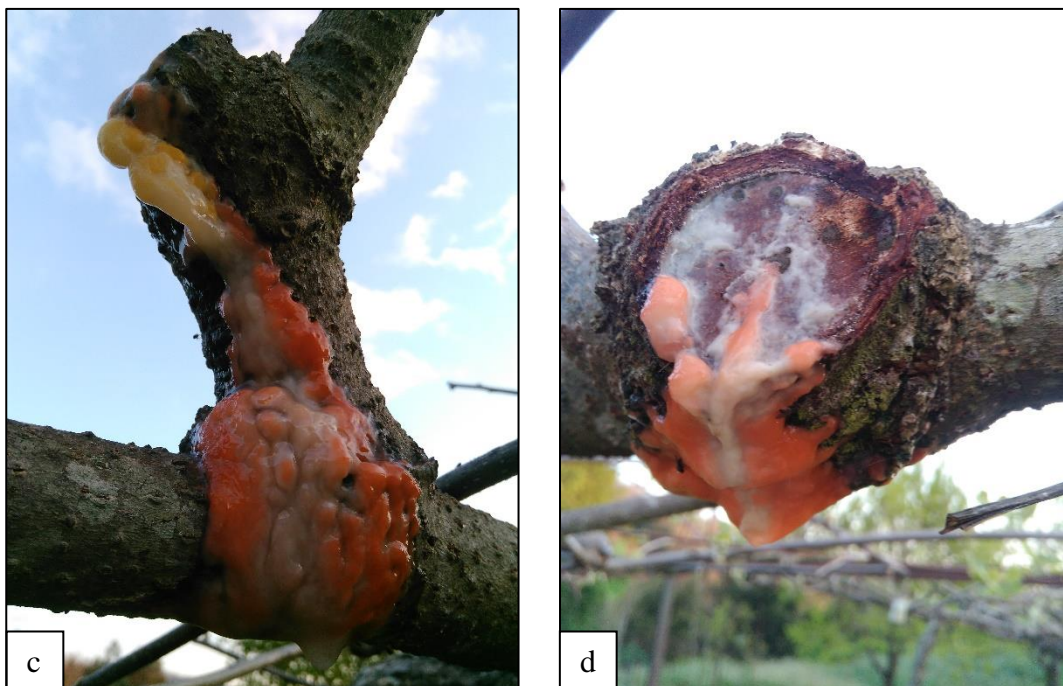


Figura 16 – (Continuação) – Produção de exsudados em *A. deliciosa* cv. “Hayward”. **c)** e **d)** Produção de exsudados alaranjados. Fotos do Autor.

1.6.5 Disseminação

Os meios de dispersão desta bactéria podem variar, através da produção de exsudados e dispersão pela ação da chuva e do vento, ou de insetos.

A dispersão da bactéria e infecção das plantas é inibida com temperaturas superiores a 27 °C, e a sua virulência é maior entre temperaturas compreendidas entre 10 – 20 °C, sendo a temperatura ótima de 15 ± 3 °C (Serizawa e Ichikawa, 1993; Cheng *et al.*, 1995).

A dispersão da bactéria a curtas distâncias, por exemplo dentro de um pomar, pode acontecer através de diversos mecanismos devido à existência de diversas fontes de inóculo como as populações epifíticas de *Psa* que não causam nenhum sintoma visível e a produção de exsudados em plantas infetadas. Nestes casos o vento desempenha um papel importante na disseminação de *Psa* pois a distância entre plantas saudáveis e infetadas é curta e existem diversas fontes de inóculo disponíveis (Vanneste, 2011d). Outro fator que pode contribuir para uma rápida dispersão é o homem, através das intervenções culturais como o caso da poda, em que as ferramentas não desinfetadas podem propagar a bactéria, ou até através de veículos, que podem constituir uma fonte de disseminação em curtas ou longas distâncias (Everett *et al.*, 2012).

Segundo Stefani & Giovanardi (2011) a dispersão pode ser feita através do pólen, seja por ação natural (abelhas e outros insetos) ou artificial (homem). Em 2011, na Nova Zelândia foi detetada a presença de Psa em pólen importado do Chile e da China, e também amostras locais de pólen mostraram estar infetadas com Psa (Vanneste *et al.*, 2011d).

A geada é um dos fatores climáticos adversos que tornam a planta mais suscetível à colonização de bactérias já existentes na planta ou que facilitam a sua entrada na planta (Ferrante & Scortichini, 2014). O estudo realizado por estes autores demonstra que o aumento populacional pode estar relacionado com o facto de as células da planta que foram danificadas pelo gelo libertarem água e nutrientes, que são importantes para a multiplicação celular das bactérias. Os resultados obtidos pelos referidos autores demonstraram que após a ocorrência de uma geada, e após dois dias de incubação, a população de Psa presente em lançamentos do ano aumentou 10 vezes mais do que a população presente em lançamentos mais antigos. A geada contribui para a entrada do patógeno através dos estomas das folhas através e de pequenas feridas causadas.

Um estudo realizado por Tyson *et al.* (2011) demonstrou que os detritos vegetais e de poda do Inverno que fiquem abrigados podem constitui um fator de inóculo para Primavera seguinte. Foi possível isolar Psa viável em folhas do chão do pomar com 5 a 6 semanas e varas de poda com 11 semanas.

A chuva tem um importante papel na dispersão do inóculo, dispersando-o de folha para folha e de planta para planta através dos salpicos provocado pelo impacto das gotas. Contudo a dispersão é local, alcançando apenas alguns metros de distância (Everett *et al.*, 2012).

O ciclo de vida de *P. syringae* pv. *actinidiae* e os sintomas associados às estações do ano, bem como os meios de disseminação de Psa estão representados na figura 17.

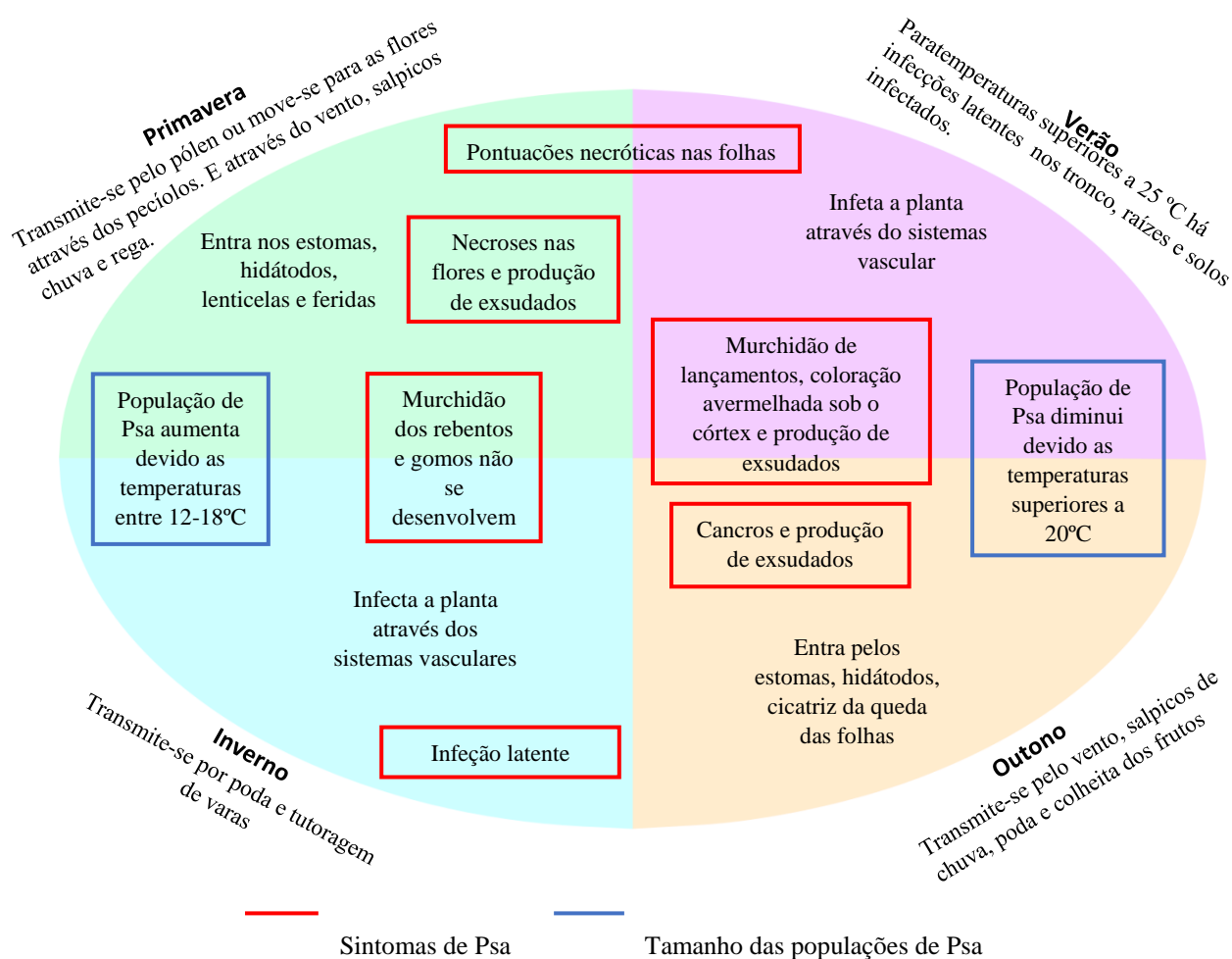


Figura 17 – Ciclo de vida de *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae*, descrevendo sintomas, doenças e meios de transmissão. Adaptado de Kim *et al.*, 2017 e Vanneste, 2017.

1.7 Meios de proteção

1.7.1 Meios de proteção culturais

O Plano de Acção Nacional para o controlo de *P. syringae* pv. *actinidiae* de 2014 da Direção Geral de Alimentação e Veterinária (DGAV, 2014) prevê medidas a prospeção, deteção, controlo e a eliminação/erradicação da doença. As plantas que apresentam exsudado ferruginoso no tronco devem ser arrancadas e destruídas (sem necessidade de confirmação laboratorial) ou sujeitas ao atarraque do tronco, até um metro do ponto abaixo de infeção. As plantas com sintomas apenas nos ramos, devem ser podadas, pelo menos 70 cm abaixo do ponto de infeção, e as que apenas apresentem sintomas foliares devem ser marcadas e podadas após a colheita (DGAV, 2014).

Todas as feridas resultantes das podas sanitárias devem ser desinfetadas e seladas com produtos apropriados, os equipamentos agrícolas devem ser desinfetados (principalmente as tesouras de poda), destruição dos detritos resultante das podas (se possível no pomar) e não devem ser levados para fora do pomar qualquer tipo de material vegetal para além dos frutos (DGAV, 2014). Segundo Vanneste *et al.* (2011) a remoção do material sintomático não remove todo o inóculo, uma vez que apenas são removidas plantas infetadas que manifestaram sintomas. Em Latina (Itália) apesar de se terem cortado as plantas doentes a doença continuou a progredir devido à presença de plantas que tenham sido infetadas e que ainda não tenham expressado os sintomas, ou de plantas nas quais Psa esteja presente de forma epifítica.

O material de colheita, no caso dos palox, deve ser verificado regularmente para evitar o transporte de matéria vegetal (folhas e varas) de forma a evitar a dispersão de Psa e deve-se proceder à desinfeção dos utensílios usados na poda (álcool a 70°C, durante 2 minutos) (Moreira e Coutinho, 2014).

Na instalação de novos pomares é necessário a utilização de plantas sãs, livre de qualquer doença, acompanhadas por um passaporte fitossanitário que garante a isenção de qualquer doença (DGAV, 2014).

1.7.2 Meios de proteção biológicos

1.7.2.1 Bacteriófagos

Os bacteriófagos caracterizam-se por serem entidades biológicas mais abundantes na biosfera, e são vírus específicos de bactérias que destroem o metabolismo dos seus hospedeiros e se replicam provocando a lise e morte do hospedeiro (Frampton *et al.*, 2014; Buttmer *et al.*, 2017).

Na Nova Zelândia foi possível obter bacteriófagos que estavam presentes em pomares com a capacidade de infetar Psa 3 e *P. syringae* pv. *actinidifoliorum* (Frampton *et al.*, 2014). Também em Portugal Garcia (2015) isolou na região do Entre Douro e Minho bacteriófagos que apresentaram a capacidade de causar a lise e morte de bactérias da população portuguesa estudada e também da estirpe italiana CFBP 7286.

Na Coreia, Yu *et al.* (2015) também isolaram bacteriófagos que atuavam contrPsa, e demonstraram ser resistentes a situações adversas garantindo que esta é uma opção

tecnicamente viável tendo em conta o local e as condições meteorológicas, pois estas influenciam o seu efeito. Mias recentemente, na China Yujie *et al.* (2018) isolaram estirpes de Psa biovar 3 e bacteriófagos, e obtiveram resultados que demonstram que os bacteriófagos isolados eram altamente específicos para certas estirpes de Psa3, sugerindo que esta é uma forma eficaz de combater a bactéria.

Os bacteriófagos são uteis, não apresentam discriminações entre estirpes de Psa resistentes a cobre e fitofármacos ou estirpes não resistentes, no entanto existem relatos de que pode ocorrer resistência a bacteriófagos. Esta resistência pode ser devida a uma mutação genética ou ao uso de uma mistura de bacteriófagos com diferentes modos de infeção (Woodcock, 2016). Iriarte *et al.* (2007), têm opinião contrária, referindo que a sua utilização para prevenção ou tratamento de doenças é limitado, devido à extrema sensibilidade a condições ambientais, como por exemplo, a exposição a raios UV que podem diminuir as populações de bacteriófagos.

1.7.2.2. *Bacillus subtilis*

Bacillus subtilis é uma bactéria Gram positiva, capaz de produzir cerca de 20 antibióticos, para além de produzir compostos ativos anti-microbianos predominantemente péptidos que podem estar envolvidos na formação de biofilmes, o que permite uma proteção avançada da cultura (Stein *et al.*, 2005).

O uso recente de *B. subtilis* para minimizar os danos causados por Psa ganhou um interesse particular devido à sua segurança, sua ampla distribuição em habitats muito diversos, a sua notável capacidade de sobreviver em condições adversas devido ao desenvolvimento de endósporos e pela capacidade de produção de compostos benéficos para fins agronómicos (Gardener, 2004; Earl *et al.*, 2008).

Serenade® Max é um biopesticida com ação bacteriostática contendo a estirpe de *B. subtilis* QST 713, que impede a infeção pelo facto de criar uma zona de inibição na folha, e pela secreção de lipopéptidos, com ação antagonista, que vão prevenir e evitar a fixação e a penetração do agente patogénico. Está autorizado pela DGAV no âmbito de usos menores para o cancro bacteriano da actínídea (Bayer® Crop Science, 2018).

Resultados recentes obtidos em Portugal por Vaz *et al.* (2018a), mostram que *B. subtilis* foi parcialmente efetivo no controle da Psa3 num pomar de 6 anos de idade e não demonstrou eficácia na proteção de folhas noutra pomar de 30 anos de idade. Os autores concluíram que

B. subtilis aplicado na floração pode ser considerado como uma solução adequada para o controle de PSA Biovar 3 apenas para o novo pomar de kiwi (6 anos de idade).

A aplicação de *B. subtilis* como agente de controle biológico contra Psa não afetou a qualidade global do fruto, ou seja, o diâmetro longitudinal e comprimento dos frutos, o teor de sólidos solúveis totais, firmeza, pH, acidez titulável e matéria seca, mas contribuiu significativamente para o aumento da produção no pomar mais jovem (6 anos) em comparação ao pomar mais velho Vaz *et al.* (2018b).

1.7.2.3 *Trichoderma*

Sabe-se que espécies do género *Trichoderma* colonizam as superfícies radiculares e penetram nas raízes, onde competem com organismos patogénicos por espaço e nutriente, libertando uma série de compostos metabólicos, incluindo antibióticos, e induzem a resistência sistémica nas plantas. (Hill, 2013). Estes autores testaram várias misturas de *Trichoderma* e verificaram que tanto em laboratório como em campo podem ter um contributo importante para a sanidade e sobrevivência das plantas quando infetadas com Psa3, sendo o controlo mais eficaz quando aplicados juntamente com outros microrganismos benéficos e / ou elicitores químicos.

De momento já se encontra disponível na Nova Zelândia um produto fitofarmacêutico da Agrimm®, o KiwiWax™, composto por três estirpes de *Trichoderma* (*T. atroviride* LU668, *T. atroviride* e *T. virens* LU753) com o objetivo de reduzir/ atenuar os sintomas de Psa (Agrimm, 2018).

1.7.3 Meios de proteção química

1.7.3.1 Cobre

O cobre é um dos micronutrientes mais utilizados na agricultura, tanto como nutriente essencial às plantas, mas também como meio de luta contra agentes fitopatogénicos (Cameron & Sarojini, 2014). Os iões de cobre interrompem os processos celulares levando a bactéria à morte, sendo a sua eficácia determinada pelo tamanho das partículas, pela retenção e pela solubilidade (Woodcock, 2016). As partículas de pequena dimensão cobrem com maior concentração de iões a área de aplicação, ficando mais tempo fixas à planta, o permite o aumento da eficácia da atividade antibacteriana do cobre. As partículas de maior dimensão estão mais sujeitas à lavagem, fixando-se por um período mais curto. A

solubilidade determina a duração da proteção que o cobre pode fornecer. Formas mais solúveis desaparecem mais rapidamente e terão que ser aplicadas mais frequentemente, enquanto que formas menos solúveis libertam iões de cobre durante mais tempo e requerem aplicações menos frequentes. Requer especial atenção o desenvolvimento vegetativo da planta, pois numa fase de maior desenvolvimento foliar as novas folhas que não são tratadas ficam mais sujeitas à infeção bacteriana (Woodcock, 2016).

A aplicação de cobre pode causar fototoxicidade, e mecanismos de resistência, como foi demonstrado em estudos de Poulter *et al.* (2017) que observou resistência de estirpes da biovar 5 ao cobre. Esta resistência acontece principalmente pela expressão dos genes *cop*, que codificam proteínas que permitem que *Psa* tolere as altas concentrações de cobre (Masami *et al.*, 2004).

1.7.3.2 Estreptomicina

A estreptomicina é um antibiótico utilizado para o controlo de doenças de plantas e é considerado o tratamento mais eficaz para *Psa*, demonstrando resultados positivos tanto em laboratório como no campo (Woodstock, 2016).

Um estudo que comparou tratamentos de cobre, com e sem aplicação de estreptomicina, obteve resultados que demonstraram que o uso do antibiótico e do cobre se traduziram em apenas 9% de folhas da amostra com danos graves provocados por *Psa*. O uso de cobre sem aplicação de antibiótico teve efeitos melhores, verificando-se que apenas 6% das folhas apresentaram danos graves (Sepúlveda & Soto, 2014).

Na Europa o uso de antibióticos na agricultura é proibido e já foram reportados casos de resistência de *Psa* à estreptomicina em pomares frequentemente pulverizados com este produto (Cameron *et al.*, 2014)

1.7.3.3 Quitosana

A quitosana é proveniente de cascas de crustáceos, sobretudo de camarão, e possui atividade antimicrobiana contra *Psa*, tendo mostrado resultados positivos nesse sentido apenas *in vitro* (Ferrante & Scortichini, 2010). As vantagens da utilização deste composto face aos químicos convencionais é a sua biodegradabilidade (Cameron e Sarojini, 2014).

Embora o modo de ação não seja totalmente conhecido tem sido classificada como bacteriostática e não bactericida. Contudo a teoria do modelo mais aceite é a interação entre

as moléculas de quitosana carregadas positivamente e as membranas celulares microbianas carregadas negativamente. Esta interação eletrostática provoca duas inteferências: i) induz mudanças nas propriedades de permeabilidade da parede da membrana, que se traduzem em desequilíbrios osmóticos internos e consequentemente inibindo o crescimento de microrganismos; ii) hidrólise dos peptidoglicanos na parede do microorganismo, levando ao vazamento de eletrólitos intracelulares (Goy *et al.*, 2009).

Os resultados obtidos por Scortichini (2014) demonstraram que a quitosana obteve melhores resultados que os compostos de cobre, em termos de redução dos sintomas da doença e na redução dos exsudados nos troncos presentes no fim do Inverno.

Na Nova Zelândia está disponível o ARMOUR-Zen®, e na Europa o Chitosanlab comercializa produtos com quitosana como princípio ativo para a agricultura.

1.7.3.4 Péptidos antimicrobianos

Os péptidos antimicrobianos são estão presentes no sistema imunitário inato do complexo multicelular dos organismos e fornecem a primeira linha de defesa contra muitos patógenos, incluindo bactérias. Estes péptidos podem ter menos de 50 aminoácidos, sendo estes anfipáticos na natureza e de carga positiva (catiônica), permitindo-lhes serem solúveis em meios aquosos o que aumenta a sua capacidade antimicrobiana (Cameron & Sarojini, 2014).

Apesar do seu modo de ação não ser totalmente conhecido sabe-se que atingem a membrana da bicamada lipídica danificando-a e provocando a lise total. No caso concreto de Psa tanto a camada externa como a interna contêm grupos aniônicos, o que permite a ligação dos péptidos antimicrobianos, pois estes têm carga positiva. Ao contrário do que acontece com o desenvolvimento de resistência aos antibióticos convencionais, a resistência aos péptidos será improvável, o que leva a pensar que poderá ser um dos melhores meios de luta ContrPsa (Cameron & Sarojini, 2014).

1.7.3.5 Indutores de defesa das plantas

Os indutores de defesa das plantas são compostos que ativam o sistema natural de defesa da planta. Acibenzolar-S-metil (ASM) é um dos indutores com melhores resultados em ensaios em estufa com *A. chinensis* e *A. deliciosa*, tendo como nome comercial Bion® na Europa e Actigard® na Nova Zelândia, sendo produtos da empresa Syngenta® (Reglinski *et al.*, 2013). Em Portugal encontra-se autorizado pela DGAV (Direção Geral de Alimentação e

Veterianria) no âmbito de usos menores para o cancro bacteriano da actínídea (DGAV, 2018).

A aplicação foliar de ASM, em condições controladas, em plantas de *A. chinensis* diminuiu significativamente a incidência de Psa, existindo evidências histológicas que sugerem que a bactéria é menos capaz de colonizar folhas tratadas com ASM do que folhas não tratadas (Reglinski *et al.*, 2013).

1.8 Metabolismo do carbono e o rendimento das culturas

Apesar de algumas bactérias possuírem mecanismos alternativos para a fixação líquida de CO₂, a grande maioria dos organismos fotossintéticos fixam carbono através do ciclo de Calvin (Leegood, 1993).

O uso da fluorescência da clorofila *a* como instrumento de avaliação da condição e performance de plantas é extensamente aplicado em estudos de fisiologia e ecofisiologia de plantas (Baker, 2008). Quando a análise de fluorescência da clorofila *a* através de um fluorímetro é complementada por uma análise de trocas gasosas através de um analisador de gás infra-vermelho (IRGA - Infra-red gas analyser), esta torna-se robusta quanto à performance fotossintética e fixação de carbono por parte das plantas (Baker, 2008). Kautsky e Hirsch (1931) demonstraram uma correlação entre a fluorescência e a assimilação de CO₂ em organismos fotossintéticos, fundamentado que alterações na fluorescência terão implicações na taxa de fotossintética.

A transferência de eletrões desde o centro de reação da clorofila do fotossistema II (PSII, P680) para o aceitador primário do PSII, quinona (Qa), é denominado de processo quenching fotoquímico. Por outro lado, existe uma outra via para o escoamento da energia recebida, nomeadamente através da perda de calor, processo denominado por quenching não fotoquímico (NPQ). O mecanismo de perda de energia NPQ funciona como uma proteção da planta para o excesso de energia recebida no fotossistema, muitas vezes associados a problemas nos centros de reação e Qa, provocados por stresses bióticos e abióticos. Problemas a este nível, irão afetar o fluxo linear de eletrões (PSII para o PSI) e consequentemente os seus produtos, nomeadamente a produção de ATP e NADPH. Estes produtos da reação de fotofosforilação são essenciais para determinadas etapas do ciclo de Calvin, responsável pela fixação de CO₂, também dependente de outros fatores, como por exemplo a quantidade e eficiência da RuBisCO para o sequestro de carbono e incorporação

no ciclo de Calvin, e o controle estomático que pode ser regulado através de diversos fatores, o qual poderá limitar a disponibilidade de CO₂ para sequestro (Baker, 2008). Variações neste mecanismo podem conduzir a alterações no crescimento e biomassa, produtividade e qualidade dos produtos agroalimentares (Driever *et al.*, 2014; Yamori *et al.*, 2016)

As plantas enfrentam constantes mudanças ambientais, e parte de seu sucesso face a essas mudanças está relacionada com a capacidade do metabolismo de carbono dar resposta às mudanças de CO₂ disponível, ou nos produtos da cadeia de transporte de elétrons ou no carbono assimilado (Leegood, 1993). Contudo, stresses bióticos podem ter repercussões ao nível do sequestro de carbono foliar e consequentemente resultar na menor produtividade das plantas (Scholes e Rolfe, 2009). O uso da fluorescência da clorofila *a* e trocas gasosas em plantas infectas por agentes patogénicos mostra ser uma ferramenta robusta para avaliar potenciais danos fotossintéticos nas plantas e de produtividade (Dan Tatagiba *et al.*, 2015). Atualmente, a ausência de estudos para metabolismo do carbono em *Actinidia* spp. infectadas com *Psa* constitui uma limitação ao conhecimento e à compreensão das consequências deste patogénio no patossistema, na performance fotossintética e na produtividade da planta. No entanto, outros estudos, como por exemplo Iqbal *et al.* (2012) demonstraram que estirpes virulentas de *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci* provocam decréscimos de determinados parâmetros fotossintéticos (F_m / F_v , F'_m / F'_v) em *Nicotiana benthamiana* na zona de inoculação e na zona envolvente. Em *Eucalyptus urophylla* suscetível e infectado com *Puccinia psidii*, foi possível verificar uma quebra fotossintética conduzindo a um estado de fotoinibição crónica (Alves *et al.*, 2011).

1.9 Avaliação da performance fotossintética em *Pseudomonas* spp.

1.9.1 Fotossíntese – *Photosynthetic Efficiency Analyser* (PEA)

O uso de materiais não destrutivos e sondas não intrusivas, como a análise de fluorescência da clorofila, permitem estimar a eficiência de transporte de elétrons *in vivo* (Leegood, 1993). A fluorescência da clorofila tornou-se uma das ferramentas mais poderosas e amplamente usadas técnicas de avaliação da fisiologia e ecofisiologia das plantas, e nenhuma investigação de performance fotossintética em campo parece estar completa sem estes dados (Maxwell & Johnson, 2000).

Um estudo de Berger *et al.* (2007) recorreu ao uso da fluorescência da clorofila para compreender a regulação da fotossíntese em plantas infectadas com um patógeno. O método

foi aplicado para detetar respostas ao stress biótico e analisar mudanças na fotossíntese na interação do organismo modelo, *A. thaliana*, com uma estirpe virulenta e não virulenta de *P. syringae* pv. *tomato* (DC3000). Além disto foi também comparado o efeito das mudanças na infecção do patógeno com a aplicação de ácido jasmónico, ácido 12-oxo-fitodienoico (OPDA) e ácido salicílico. A avaliação da fluorescência da clorofila em conjunto com outras técnicas, demonstraram uma quebra na fotossíntese nas duas estirpes de *Pseudomonas* e com tratamento com OPDA.

Rajendran *et al.* (2016) demonstraram que as respostas de plantas na fotossíntese dependem do grau de severidade da infecção, neste caso de *Pseudomonas cichorii*. A infecção deste patógeno induziu alterações nos parâmetros de fluorescência da clorofila antes da manifestação visível dos sintomas, e as infecções sem sintomas também induziram mudanças nos parâmetros fotossintéticos. Os resultados obtidos sugerem que as medições de fluorescência da clorofila podem ser usadas como marcadores de infecção.

1.9.2 Trocas gasosas - Infrared Gas Analyzer (IRGA)

As folhas são órgãos fotossintéticos que absorvem luz e convertem a energia luminosa (do fóton) em energia química para uso na assimilação de CO². As taxas de trocas de gasosas variam dependendo das condições ambientais, como luz, temperatura, concentração de CO² e humidade. Essas taxas também variam entre as folhas, dependendo da ontogenia foliar e dos ambientes de crescimento, mesmo dentro de uma planta individual (Hikosaka, 2016).

Li *et al.* (2014) avaliaram o efeito de infecção de *P. syringae* pv. *tomato* (DC3000) através dos estomas nas folhas de tomateiro, inoculadas com a bactéria, em condições de CO² ambiente e de elevada concentração, tendo também sido testado o efeito da aplicação de óxido nítrico nos dois ambientes. Os resultados obtidos demonstraram que a suscetibilidade de plantas de tomateiro a *P. syringae* é reduzida sob condições elevadas de CO².

A luz é um dos principais fatores externos que influenciam o crescimento e o desenvolvimento das plantas. Yang *et al.* (2015) analisaram o papel da luz vermelha na resistência do tomateiro a *P. syringae* pv. *tomato* (DC3000) e verificaram que as plantas exibiram mudanças diurnas na suscetibilidade à estirpe DC3000, que são mais suscetíveis à noite. O tratamento noturno com luz vermelha aumentou significativamente a resistência da estirpe de *P. syringae* pv. *tomato* DC3000.

1.10 Objetivos

A ausência de estudos sobre a avaliação das trocas gasosas e da fluorescência da clorofila, até à data, constitui uma limitação para o conhecimento e compreensão das consequências causadas pela bactéria *P. syringae* pv. *actinidea* na performance fotossintética e na produtividade das plantas.

Este trabalho tem como objetivo estudar o metabolismo do carbono/fotossíntese de plantas de actinídea infetadas com Psa3 e de plantas sãs, tratadas e não tratadas com *B. subtilis* num pomar composto por plantas com aproximadamente 6 e 30 anos de idade.

O estudo do metabolismo de carbono neste pomar realizou-se em 2017 antes da colheita comercial dos frutos, através da fluorescência da clorofila e das trocas gasosas, de modo a tentar estabelecer possíveis correlações com a incidência e severidade da doença. Para completar os dados obtidos foram realizadas análises de quantificação de pigmentos, conteúdo de RuBisCo, açúcares solúveis totais e amido.

Foi ainda objetivo deste trabalho dar continuidade ao estudo iniciado por Vaz (2017; Vaz *et al.*, 2018) no mesmo pomar, analisando-se os parâmetros qualitativos dos frutos, de modo a tentar perceber se existem diferenças na qualidade dos frutos de plantas com diferentes idades, submetidos ou não a tratamentos com *B. subtilis*.

2 Material e métodos

2.1 Caracterização dos pomares, tratamentos e colheita de amostras

O pomar onde foi realizada a parte experimental deste trabalho e onde foram colhidas amostras para análise laboratorial, localiza-se em Valença do Minho, na freguesia de Friestas (N 42° 3' 2,642 " O 8° 34' 25,474") a uma altitude de cerca de 30 m, e tem uma área de cerca de 1,15 ha.

O pomar é constituído por 2 áreas, uma com plantas com cerca de 6 anos (designado neste trabalho como pomar novo) e outra área com plantas com cerca de 30 anos (designado neste trabalho como pomar velho). As plantas femininas são da cv. “Hayward”, e as masculinas das cv. “Tomuri”, “Matua” e “Chieftain”. O compasso de plantação do pomar é de 4 m x 3 m, perfazendo uma densidade de plantas de cerca de 830 plantas/ha. A forma de condução das plantas é em cruzeta ou “T-bar”, através de postes verticais com cerca de 2,00 m de altura e com uma estrutura horizontal no topo (a cruzeta), com dimensões que variam entre 1,5 m para as fêmeas e 2,0 m para os machos, que suportam a zona central da planta. No pomar está instalado um sistema de rega por microaspersão com um débito de cerca de 1L.min⁻¹. As operações culturais que se realizam incidem principalmente na manutenção do pomar, assegurando que o vigor e crescimento dos ramos seja o mais adequado para se atingir os objetivos de produção e de qualidade pretendidos. No quadro 5 é apresentada a calendarização das operações culturais que são realizadas anualmente.

Quadro 5 – Calendarização das operações culturais realizadas no pomar em 2017 (Vaz, 2017).

Operações culturais	Jan	Fev	Mar	Abr	Mai	Jun	Jul	Ago	Set	Out	Nov	Dez
Poda de Inverno												
Empa e atado												
Monda floral												
Poda dos machos												
Monda de frutos												
Poda em verde												
Colheita												

A aplicação de *B. subtilis* foi realizada utilizando o produto comercial Serenade® Max, da empresa Bayer® Crop Science, sendo um pó molhável com 15,67% de *B. subtilis* QST 713 ($5,13 \times 10^{10}$ ufc/g).

A aplicação foi realizada na época de floração de acordo com as recomendações indicadas pelo fabricante, de 2,5 – 4 kg de produto comercial por ha e uma concentração, de 0,417 – 1 kg/hL, levando a que o volume de calda seja de 400 a 600 L/ha. Utilizou-se uma concentração de 1 kg/hL e com um volume de calda de 400 L/ha para o estudo, tendo sido feitas as pulverizações com um atomizador acoplado ao trator. O produto tem uma ação bacteriostática, atua por contacto possuindo um largo espectro de ação, uma persistência de 7 dias e um intervalo de segurança de 3 dias (Vaz, 2017).

Foram efetuadas 4 aplicações, sendo a primeira foi realizada na terceira semana de maio de 2017, com intervalos de 4 dias entre a primeira e a segunda aplicação, pois durante a aplicação existiu alguma precipitação que poderia ter comprometido a aplicação do produto comercial e, portanto, o intervalo entre aplicações foi reduzido perante os 7 dias de persistência biológica. As restantes aplicações tiveram intervalos de cerca de 3 dias, pois a floração estava a ocorrer com alguma rapidez, e, portanto, a percentagem de flores abertas era cada vez maior com o avançar do tempo (Vaz, 2017).

2.2 Delineamento experimental

Foram utilizados para este estudo dois grupos primários, com 20 plantas cada, incluindo plantas novas (aproximadamente 6 anos) e plantas velhas (30 anos). Cada grupo foi subdividido em 4 subgrupos de 5 plantas ($n=5$), considerando os sintomas causados por Psa, e o tratamento com *B. subtilis*: 1- plantas sintomáticas tratadas com *B. subtilis*; 2- plantas sintomáticas sem tratamento de *B. subtilis*; 3- plantas assintomáticas tratadas com *B. subtilis*; 4- plantas assintomáticas sem tratamento de *B. subtilis*.

A figura 18 representa o esquema das plantas utilizado para o estudo, e exemplos das folhas de cada uma das 8 condições estudadas. Para cada condição foi atribuído um código que identifica a idade da planta, se tem ou não sintomas de Psa, e se foi ou não tratada com *B. subtilis*. NSB – Plantas novas sintomáticas com *B. subtilis*; NS – Plantas novas sintomáticas sem *B. subtilis*; NAB – Plantas novas assintomáticas com *B. subtilis*; NA – Plantas novas sem *B. subtilis*; VSB – Plantas velhas sintomáticas com *B. subtilis*; VS – Plantas velhas sem *B. subtilis*; VAB – Plantas velhas com *B. subtilis*; VA – Plantas velhas sem *B. subtilis*.

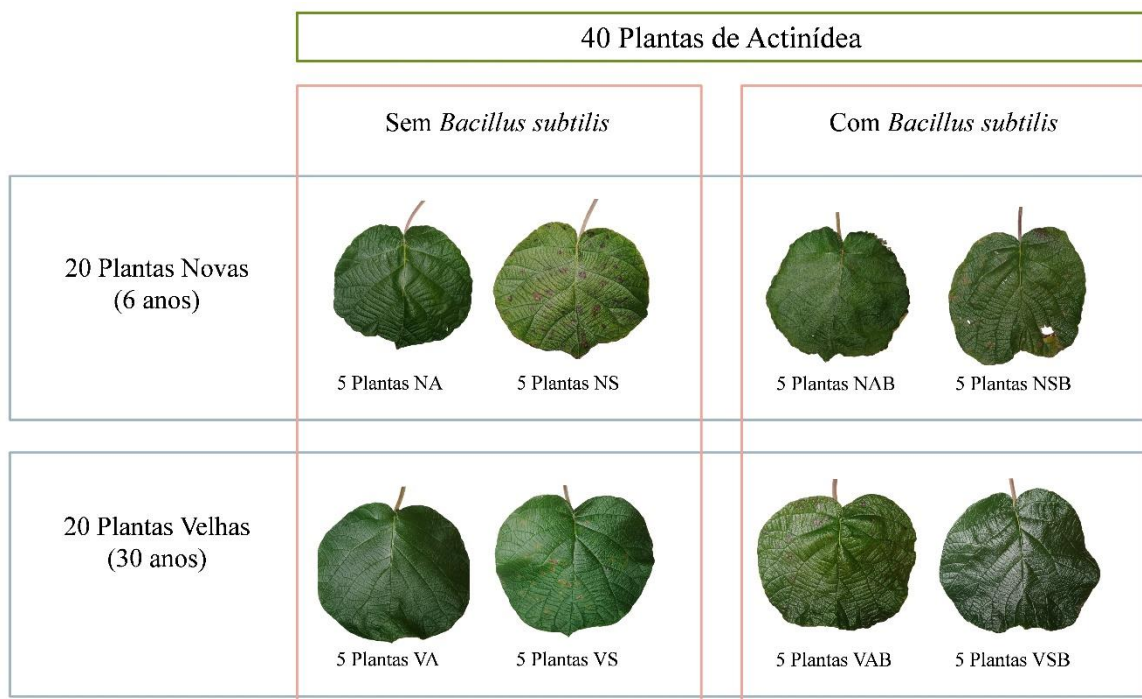


Figura 18 - Representação esquemática das plantas em estudo.

Para os parâmetros qualitativos dos frutos foi usado um desenho experimental que inclui dois fatores (Pomar e Serenade Max®), e três repetições. Cada fator com dois níveis, resultando num ensaio com quatro tratamentos:

1. Pomar Novo com Serenade Max®;
2. Pomar Novo sem Serenade Max®;
3. Pomar velho Com Serenade Max®;
4. Pomar Velho sem Serenade Max®.

2.3 Quantificação de pigmentos

Para cada uma das 8 condições em estudo foram seleccionadas 5 plantas idênticas e por cada planta foram retiradas 10 folhas. Todas as folhas aparentavam a mesma idade e foram seleccionas as que estavam na parte superior da copa da planta, com boa exposição solar. As folhas seleccionadas para armazenamento e consequente ensaio de análise de pigmentos e subsequentes análises foram previamente (antes da remoção) utilizadas para análise da fluorescência da clorofila (ver secção 2.4) e trocas gasosas (ver secção 2.5).

As folhas foram transportadas para o laboratório em condições controladas, ou seja, temperatura aproximadamente de 20°C e com elevada humidade relativa (HR%).

Em laboratório, as folhas foram rapidamente maceradas em azoto líquido formando assim uma *pool* para cada condição em estudo e posteriormente conservados numa arca (-80°C) (Snijders scientific, Holanda) para os restantes ensaios. Para quantificação de pigmentos foram usadas 3 réplicas técnicas a partir da *pool* de cada condição e para cada réplica foram realizados 3 triplicados. Os pigmentos foram extraídos usando tampão de extração de pigmentos (TEP) constituído por acetona:tampão Tris 50 mM (80:20, v/v). As réplicas de cada condição com 0,1 g de massa fresca foram maceradas em gelo a 4 °C num almofariz com ajuda de um pilão durante aproximadamente 1 minuto usando 1,5 mL de TEP. Após a obtenção dos macerados, estes foram pipetados individualmente para o respetivo tubo de Falcon de 15 mL previamente identificado e isolado com papel de alumínio. Os tubos foram por ordem mantidos em gelo até ao final do processo de maceração. Aos tubos de Falcon foram adicionados mais 1,5 mL de TEP até perfazer o volume final de 3 mL. Seguidamente este passo os tubos foram agitados em vórtex (VWR®, Analog Vortex Mixer, U.S.A.) durante 30s foram colocados a centrifugar (Eppendorf®, centrifuge 5810 R, Alemanha) por 10 minutos em 10 000 x g a 4°C.

Retirados os tubos da centrífuga, contendo as 3 réplicas de cada condição, procedeu-se a realização dos triplicados, com 150 µL cada, para todas as réplicas. Os triplicados foram colocados numa placa de 96 poços (Costar – Merck, Alemanha), sendo utilizado como branco a amostra da solução de extração. A quantificação dos pigmentos foi avaliada por espectrofotometria usando um leitor de microplacas (Thermo Fisher Scientific®, Multiskan Go, USA). Os comprimentos de onda (λ) utilizados para leitura das absorvências dos pigmentos foram: 470, 537, 647 e 663 nm de acordo com Sims & Gamon, 2002; Dias *et al.* 2013). A quantidade de clorofila *a*, clorofila *b*, carotenoides e antocianinas em mg/g de matéria fresca (mg/gMF) foi calculada usando as seguintes fórmulas (Sims & Gamon, 2002):

- Clorofila *a* = $0,01373 A_{663} - 0,000897 A_{537} - 0,003046 A_{647}$;
- Clorofila *b* = $0,02405 A_{647} - 0,004305 A_{537} - 0,005507 A_{663}$;
- Carotenoides = $\frac{(A_{470} - (17,1 \times (\text{Chl } a + \text{Chl } b) - 9,479 \times \text{Antocianinas}))}{119,26}$;
- Antocianinas = $0,08173 A_{537} - 0,00697 A_{647} - 0,002228 A_{663}$.

2.4 Avaliação da fluorescência da clorofila

A fluorescência da clorofila é essencial para a melhor rendimento da fotofosforilação realizada pela planta. Para a avaliação dos diversos parâmetros de fluorescência, foram selecionadas aleatoriamente 5 folhas por cada planta de cada tratamento (NA, NS, NAB, NSB, VA, VS, VAB e VSB), sendo que cada tratamento tem 5 plantas, num total de 2 folhas por cada.

Foi usado um fluorímetro portátil (Hanstech Instruments®, Handy PEA, Norfolk, Reino Unido) para medir a produção mínima de fluorescência em folhas adaptadas ao escuro, com todos os centros PSII abertos (F_0), incidiu-se uma luz modulada fraca. Posteriormente, aplicou-se um 0,77s um pulso de saturação de luz branca ($> 1000 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$), avaliando o rendimento máximo de fluorescência da amostra adaptada ao escuro com todos os centros de PSII fechados (F_m).

A adaptação ao escuro foi realizada através da colocação de molas que possuem uma pequena placa de obturador, fechado, sobre a folha quando o clipe é preso de forma que a luz seja excluída e a adaptação escura ocorra durante 30 minutos. O corpo das molas é construído em plástico branco para minimizar os efeitos do acúmulo de calor na folha durante o período em que o clipe está colocado na folha. A secção anelar do clipe, que faz interface com o conjunto ótico do fluorímetro, é construída em plástico preto garantindo assim que a medição não seja afetada por condições de alta intensidade de luz ambiente (Hanstech Instruments, 2018).

Os mesmos parâmetros (F_0' e F_m') também foram avaliados para a luz, em folhas iluminadas após 30 min de adaptação à luz. Os valores variáveis de fluorescência das condições anteriores (F_v e F_v') também foram calculados a partir das diferenças de $F_m - F_0$ e $F_m' - F_0'$, respetivamente. F_v / F_m e F_v' / F_m' foram então calculados para avaliar a eficiência máxima de PSII e a eficiência fotoquímica efetiva do PSII (ΦPSII ou ΦII) (Maxwell e Johnson, 2000).

A figura 19 representa a avaliação dos parâmetros mencionados anteriormente na avaliação da clorofila, e a figura 20 as molas usadas para a simulação do escuro.



Figura 19 – Avaliação da fluorescência da clorofila, **a)** avaliação em folhas iluminadas, **b)** avaliação em folhas adaptadas ao escuro (30/9/2017). Fotos do autor.



Figura 20 – Molas usadas para a adaptação das folhas ao escuro durante 30 minutos para a avaliação da fluorescência da clorofila (30/9/2017). Fotos do autor.

Outros parâmetros definidos por Klughammer e Serebier (2008) também foram determinados, incluindo:

- $qP = \frac{(F'_m - F')}{(F'_m - F'_0)}$ = Dissipação fotoquímica;
- $qL = \frac{(F'_m - F) \times F'_0}{(F'_m - F'_0) \times F}$ = Fração de centros PSII abertos baseada em um modelo de lago;

O fluxo excessivo de luz (PE) foi calculado como Korniyev *et al.* (2003), e o parâmetro taxa de transporte de elétrons (ETR) foi calculado como Wu *et al.* (2014).

2.5 Trocas gasosas

As trocas gasosas e a assimilação líquida de CO₂ estão intrinsecamente ligadas ao fixação de carbono e por consequente relacionadas com a eficiência do ciclo de Calvin. Para a análise das trocas gasosas foliares, foi utilizado o sistema de fotossíntese portátil (LI-COR, Li-6400XT, U.S.A.) que permite medir alterações na dinâmica da folha em tempo real (não existe tubulação da câmara de folhas e a consola permite que não haja atrasos temporais que provoquem erros de leitura em fatores ambientais como por exemplo a luz e a concentração de CO₂).

As medições ocorreram nas mesmas folhas onde foram medidos os parâmetros da fluorescência da clorofila (Fig. 21). Para cada análise, as folhas estavam sujeitas às mesmas condições, ou seja, sob uma idêntica concentração atmosférica de CO₂ conferida pela câmara de detecção e sob a mesma intensidade de radiação infravermelha necessária para a detecção dos diferentes parâmetros. Os parâmetros individuais foram analisados de acordo com Machado *et al.*, (2017):

- E - Taxa de transpiração ($\text{mol} / \text{m}^2 / \text{s}$);
- gs - Condutância estomática ($\text{mol} / \text{m}^2 / \text{s}$);
- P_N - Taxa fotossintética líquida ($\mu\text{mol} / \text{m}^2 / \text{s}$);
- P_n/gs – Eficiência intrínseca do uso da água;
- C_i/C_a – Razão fração molar de CO₂ intercelular/ fração molar de CO₂ ambiente.



Figura 21 – Avaliação das trocas gasosas (30/9/2017). Fotos do autor.

2.6 RuBisCo

Para avaliar a quantidade relativa da RuBisCo, procedeu-se à extração de proteínas das amostras foliares. O tampão de extração foi constituído por: Tampão Fosfato 0,1M (pH= 7,0); Na₂EDTA (disódioetileno-di-amiotetracetato di-hidratado) 0,5M; 1% PVP; 1mM PMSF (fluoreto de fenilmetanolsulfonil); Triton X-100 0,2% (v/v) e 2mM DTT (1,4-ditiotreitol). Em gelo, 0,2g de matéria fresca de cada uma das condições em estudo foram homogeneizadas num almofariz para a extração de proteínas solúveis totais (PST) usando 1,5mL de tampão de extração. O homogenizado foi transferido para tubos eppendorf de 2mL de volume e posteriormente centrifugados em 8000xg durante 15 minutos a 4°C (Mariz-Ponte *et al.* 2018).

A quantificação de PST foi realizada de acordo com o método descrito por Bradford (1976). Foram usados 5 µL de amostra para 150 µL de reagente de Bradford (Thermo Fisher (Kandel) GmbH®, Alfa Asear, Alemanha) procedendo aos respetivos triplicados por cada réplica em microplaca de 96 poços, usando o tampão de extração como branco da reação. A reação decorreu durante 15 minutos, prosseguindo com a consequente leitura das absorvências no leitor de microplacas (Thermo Fisher Scientific®, Multiskan Go, USA) no comprimento de onda de 595 nm. Para quantificação das PST foi elaborada ao mesmo tempo uma reta de calibração usando como proteína padrão a Albumina Soro de Bovino (BSA, 2mg/mL; Merck®, DE) em concentrações crescentes (0-1,5mg/mL) onde se obteve a seguinte reta padrão e coeficiente de correlação (R^2): $y = 0,0145x - 0,0016$ ($R^2 = 0,987$).

Para quantificação relativa da RuBisCO foram usados 15 µg de proteínas, posteriormente separadas em gel de SDS-PAGE e os géis foram corados com 0,25% de Coomassie Brilliant Blue R250, conforme descrito por Li *et al.*, (2013). As bandas de proteína foram analisadas por comparação com um marcador de peso molecular de proteína (Fermentas, SM0441). O conteúdo relativo de RuBisCO foi realizado pelo isolamento de bandas das subunidades pequena e grande, tal como a as bandas correspondentes às PST sem as subunidades da RuBisCO para cada amostra e posteriormente incubação durante a noite em formamida (2 mL) a 50°C.

Os triplicados foram colocados numa placa de 96 poços (Merck® - Costar Alemanha), com 150 µL cada para a respetiva réplica, sendo avaliada por espectrofotometria usando um leitor de microplacas (Thermo Fisher Scientific®, Multiskan Go, USA). A absorvância foi medida

a 595 nm e os resultados foram expressos como ABSRC / ABSTPC, em que RC é o conteúdo de RuBisCO e TPC é o teor total de proteína solúvel.

2.7 Açúcares soluveis totais (AST)

Da mesma pool já referida na secção 2.2 foram utilizados 50 mg de folhas conservadas numa arca (-80°C) (Snijders scientific®, Alemanha). Para a quantificação de açúcares solúveis totais, de acordo com Irioyen *et al.* (1992), foram usadas 3 réplicas e para cada réplica 3 triplicados. As réplicas de cada condição com 50 mg de massa fresca foram maceradas em gelo a 4 °C num almofariz com ajuda de um pilão durante aproximadamente 1 minuto usando 10 mL de etanol a 80%. À medida que se realiza este processo os macerados são conservados em gelo. Após a obtenção dos macerados, estes foram pipetados individualmente para o respetivo tubo de Falcon de 15 mL previamente identificado e colocados num banho (Thermolab®, GFL 1083, India) a 80°C durante 1 hora. No final deste processo os tubos foram colocados em gelo durante 10 minutos, e seguidamente agitados em vórtex (VWR®, Analog Vortex Mixer, U.S.A.) para serem colocados a centrifugar (Eppendorf®, centrifuge 5810 R, Alemanha) por 10 minutos em 10 000 xg a 4°C.

Concluído o processo de centrifugação, retiram-se 30 µL do sobrenadante para um novo tubo de eppendorf ao qual se adiciona 0,75 mL de solução de antrona. A solução de antrona foi previamente preparada em hotte (Waldner, mc6, Alemanha), sendo composta por 40g mg de antrona dissolvida em 20 ml de ácido sulfúrico (VWR, 98%) e 1 ml de água destilada. A solução resultante é colocada num banho (Thermolab, GFL 1083, India) a 100 °C por um período de 10 minutos, e de seguida, para parar a reação, os tubos são colocados em gelo durante 15 minutos.

De seguida foram colocados em triplicados com 150 µL cada para a respetiva réplica numa placa de 96 poços (Merck® - Costar Alemanha). A quantificação dos pigmentos foi avaliada por espectofotometria usando um leitor de microplacas (Thermo Fisher Scientific®, Multiskan Go, USA) (Dias *et al.*, 2013). Os comprimentos de onda utilizados para leitura das absorvências dos açúcares foi de 625 nm e foi utilizado para o branco uma solução de 0,75 mL de antrona com 30 µL de etanol.

2.8 Amido

O sedimento (pellet) originado no protocolo de AST, após a centrifugação por 10 minutos em 10 000 xg a 4°C, foi tratado de acordo com Osaki *et al.* (1992) para a quantificação de amido. No seguimento daquele protocolo foram utilizadas as mesmas réplicas, e cada réplica deu origem a um novo triplicado referente ao protocolo infracitado.

Retirou-se o restante sobrenadante dos tubos de falcon, ficando somente o sedimento de cada réplica. Para cada tubo adicionou-se 5 mL de ácido perclórico (Fisher Chemical®, 70%) a 30%. Seguidamente os tubos foram agitados em vórtex (VWR®, Analog Vortex Mixer, U.S.A.) durante 30s, para homogeneizar a amostra, e posteriormente colocadas em banho (Thermolab®, GFL 1083, India) a 60°C durante uma hora. Após o banho os tubos foram colocados em gelo para parar a reação durante 10 minutos.

De seguida os tubos foram agitados em vórtex (VWR®, Analog Vortex Mixer, U.S.A.) por 30s e colocados a centrifugar (Eppendorf®, centrifuge 5810 R, Alemanha) por 10 minutos em 10 000 xg a 4°C. Concluído o processo de centrifugação foi retirado 30 µL do sobrenadante para um novo tubo de eppendorf ao qual se adicionou 0,75 mL de solução de antrona (40g mg de antrona dissolvida em 20 ml de ácido sulfúrico (VWR®, 98%) e 1 mL de água destilada). A solução resultante foi colocada num banho (Thermolab®, GFL 1083, India) a 100 °C por um período de 10 minutos, e de seguida, para parar a reação, os tubos foram colocados em gelo durante 15 minutos.

Posteriormente, os tubos foram colocados em triplicados com 150 µL cada para a respetiva réplica numa placa de 96 poços (Merck® - Costar, Alemanha). A quantificação dos pigmentos foi avaliada por espectofotometria usando um leitor de microplacas (Thermo Fisher Scientific®, Multiskan Go, USA) (Dias *et al.*, 2013). Os comprimentos de onda utilizados para leitura das absorvências do amido foi de 625 nm e foi utilizado para o branco uma solução de 0,75mL de antrona com 30µL de ácido perclórico, a 30%.

2.9 Avaliação da qualidade dos frutos em 2017

No seguimento do estudo iniciado por Vaz (2017), no mesmo pomar, que avaliou a produtividade e a qualidade nos frutos de 2016 e a produtividade em 2017, deu-se continuidade ao seu trabalho avaliando a qualidade dos frutos em 2017.

Para a avaliação dos parâmetros de qualidade analisou-se:

- calibre (transversal e longitudinal);
- peso fresco e seco (matéria seca);
- teor de sólidos solúveis totais (°Brix);
- consistência da polpa (firmeza);
- pH;
- acidez total titulável.

Para estas análises utilizaram-se seis amostras do pomar novo (3 com Serenade Max e 3 sem Serenade Max[®]) e seis amostras do pomar velho (3 com Serenade Max[®] e 3 sem Serenade Max[®]), sendo constituída por 10 frutos cada amostra (colhidos aleatoriamente). Os frutos foram colhidos no dia 16 de novembro de 2017, e analisados no mesmo dia em laboratório.

O calibre dos frutos foi determinado através de uma craveira (ou paquímetro) analógica medindo 2 vezes o diâmetro maior e o diâmetro menor de cada fruto.

O grau Brix (SST – Sólidos solúveis totais) foi obtido através de trituração dos frutos com a finalidade de produzir sumo da polpa, tendo-se utilizado um refratômetro digital (Atago[®], Pen-Wine, U.S.A.).

A consistência da polpa foi obtida através da utilização do penetrômetro manual (TR[®], Turoni[®], Italy), utilizando-se uma célula de carga de 6 mm. Foi feito um corte longitudinal no epicarpo do fruto, e foram feitas medições nas duas faces ortogonais de cada.

O pH e a acidez total titulável (ATT) foram obtidos através de um titulador automático (pH Burette 24, Crison, Espanha). Esta titulação foi realizada com NaOH 0,1M (pH 8,0) usando 5 mL de sumo de kiwi diluído em água destilada até perfazer 45 mL de volume final. O cálculo foi efetuado através da equação seguinte (Tyl & Sadler, 2017):

$$ATT \text{ (g/100mL)} = \frac{n \times N \times Eq}{10 \times V}$$

- N = normalidade da solução de hidróxido de sódio.
- n = volume da solução de hidróxido de sódio gastos na titulação em mL.
- V = volume da amostra em mL.
- Eq = Peso equivalente do ácido cítrico.

A percentagem de matéria seca foi obtida através da secagem de quartos dos frutos numa estufa ventilada (MMM Medcenter Einrichtungen GmbH®, Venticell 404 L, Alemanha) a 60 °C durante 48 horas.

2.10 Análise estatística dos dados

A análise de variância (ANOVA) foi efetuada no Software SPSS® 17.0 para o Windows, considerando as diferenças significativas para valores de $p < 0.05$, e os gráficos obtidos foram obtidos no Software GraphPad Prism® 6 para o Windows.

3 Resultados

3.1 Quantificação de pigmentos

Os parâmetros analisados na quantificação de pigmentos permitiram obter dados relativos à clorofila *a* (chl *a*), clorofila *b* (chl *b*), antocianinas e carotenoides.

Relativamente a clorofila *a* verificaram-se valores significativamente ($p < 0.05$) menores nas plantas sintomáticas em comparação com as plantas assintomáticas, quer nas plantas novas e nas plantas velhas, com exceção para VSB apenas com menor teor em clorofila ($p < 0.05$) relativamente a NAB e VA (Fig. 22 I).

Os valores da clorofila *b* demonstram uma redução significativa nas plantas sintomáticas face às assintomáticas, quer sejam tratadas com *B. subtilis* ou não, seja em plantas novas como em plantas velhas, com exceção da condição VSB. As condições NAB e VA apresentam os valores significativamente mais elevados comparativamente as restantes condições, e as condições NS, NSB e VS apresentam os valores mais baixos, o mesmo se verificou anteriormente na análise da Chl *a* (Fig. 22 II).

Relativamente à concentração antocianinas foliares, NS apresentou uma concentração significativamente superior e VSB uma concentração inferior ($p < 0.05$) em comparação com as restantes condições em estudo. Apesar de não se verificar uma diferença significativa entre NS-NSB e VS-VSB existe uma diferença de aproximadamente 17,90% e 35,36%, respetivamente (Fig. 22 III).

O conteúdo em carotenoides variou em função das condições analisadas, contudo, apenas apresentou valores significativamente mais elevados para NAB e o mais baixo de VS ($p < 0.05$, Fig. 22 IV).

O rácio clorofila *a* / clorofila *b* registou diferenças significativas entre algumas das condições e apresenta valores superiores nas plantas tratadas com *B. subtilis*, exceto na condição NAB que apresenta um valor inferior a NA. Entre VA-VS verificou-se uma diferença de 4,4% contudo não significativa, e entre VAB-VSB registou-se uma diferença significativa de 8,08%. (Fig. 22 V)

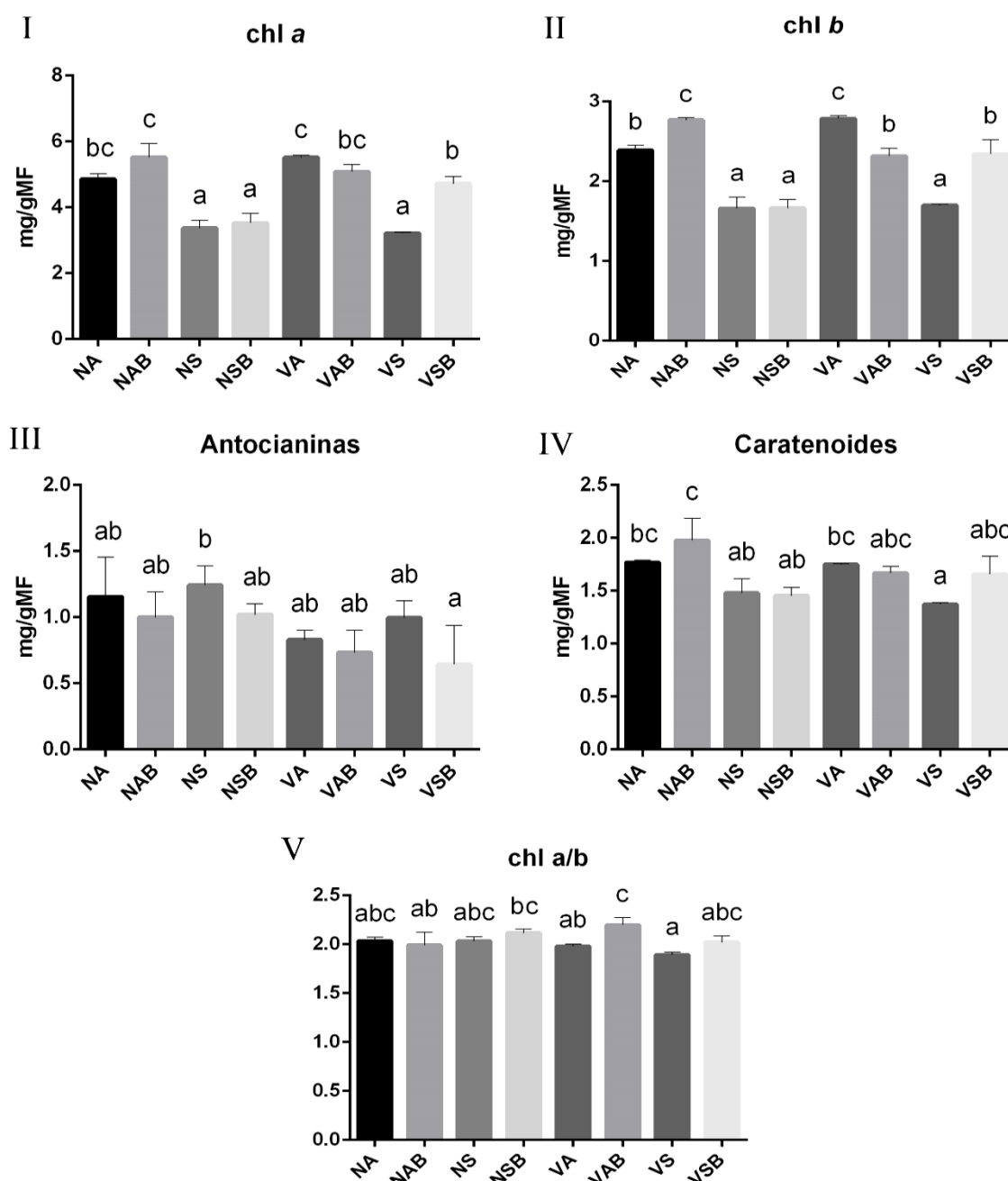


Figura 22 – Quantificação de pigmentos foliares em plantas de *A. deliciosa* cv. “Hayward”: **I** – Clorofila *a* (Chl *a*) em miligrama por grama de matéria fresca; **II** – Clorofila *b* (Chl *b*) em miligrama por grama de matéria fresca; **III** – Antocianinas em miligrama por grama de matéria fresca; **IV** – Carotenoides em miligrama por grama de matéria fresca; **V** – Rácio clorofila *a/b*. NA – Plantas novas sem *B. subtilis*; NAB – Plantas novas assintomáticas com *B. subtilis*; NS – Plantas novas sintomáticas sem *B. subtilis*; NSB – Plantas novas sintomáticas com *B. subtilis*; VA – Plantas velhas sem *B. subtilis*; VAB – Plantas velhas com *B. subtilis*; VS – Plantas velhas sem *B. subtilis*; VSB – Plantas velhas sintomáticas com *B. subtilis*. As diferentes letras sobre cada condição indicam a existência de diferenças significativas ($p < 0,05$) entre estas, de acordo com o teste de Tukey HSD (one way ANOVA), e as barras de erro indicam o desvio padrão.

3.2 Avaliação da fluorescência da clorofila

A eficiência do PSII (ϕ PSII) não apresentou diferenças significativas entre as diferentes condições em estudo, contudo ao comparar NS-NSB e VS-VSB existe uma diferença de aproximadamente 8,47% e 46,84%, respectivamente (Fig. 23 I).

As condições não tratadas apresentam valores superiores às tratadas na dissipação fotoquímica (qP) e a fração dos centros de reação do PSII abertos (qL), à exceção de VS face a VSB, não havendo diferenças significativas entre as condições em estudo (Fig. 23 II e III).

As plantas novas e velhas não tratadas apresentaram valores superiores as tratadas com *B. subtilis* na dissipação não fotoquímica (qN), no entanto não se verificaram diferenças significativas (Fig. 23 IV).

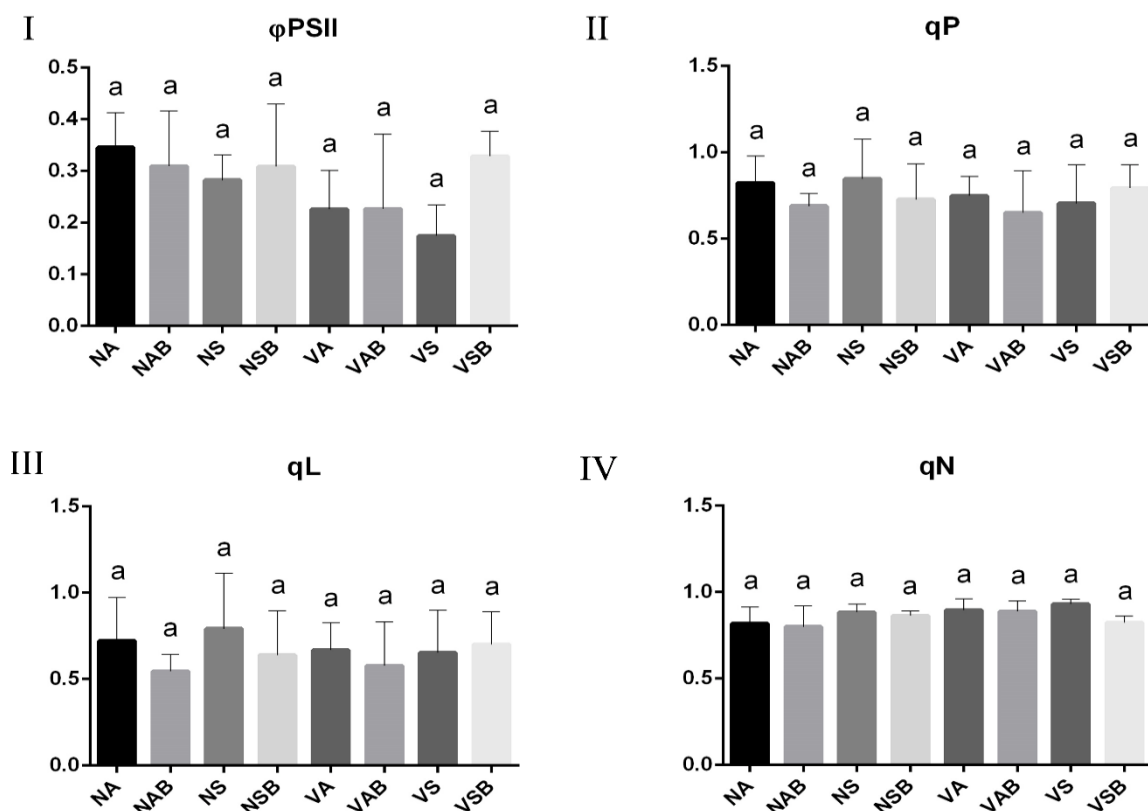


Figura 23 – Avaliação da fluorescência da clorofila em folhas de *A. deliciosa* cv. “Hayward”: **I** – Eficiência do PSII (ϕ PSII); **II** – Dissipação Fotoquímica (qP); **III** – Fração dos centros de reação do PSII abertos (qL); **IV** – Dissipação não fotoquímica (qN). NA – Plantas novas sem *B. subtilis*; NAB – Plantas novas assintomáticas com *B. subtilis*; NS – Plantas novas sintomáticas sem *B. subtilis*; NSB – Plantas novas sintomáticas com *B. subtilis*; VA – Plantas velhas sem *B. subtilis*; VAB – Plantas velhas com *B. subtilis*; VS – Plantas velhas sem *B. subtilis*; VSB – Plantas velhas sintomáticas com *B. subtilis*. As diferentes letras sobre cada condição indicam a existência de diferenças significativas ($p < 0,05$) entre estas, de acordo com o teste de Tukey HSD (one way ANOVA), e as barras de erro indicam o desvio padrão.

A amplitude da fluorescência (F_v) registou uma diferença de 11,83% entre NS e NSB, as condições tratadas com *B. subtilis*, à exceção de NAB, apresentaram valores superiores as não tratadas. Não foram registadas diferenças significativas entre as diferentes condições. (Fig. 24 I).

A fluorescência máxima (F_m) demonstrou diferenças significativas entre VS e VSB com uma diferença de 18,92%. Nas plantas velhas as condições não tratadas com *B. subtilis* apresentam valores superiores as tratadas, e nas plantas novas verifica-se o mesmo entre NA e NAB à exceção de NSB que é superior ao NS (Fig. 24 II).

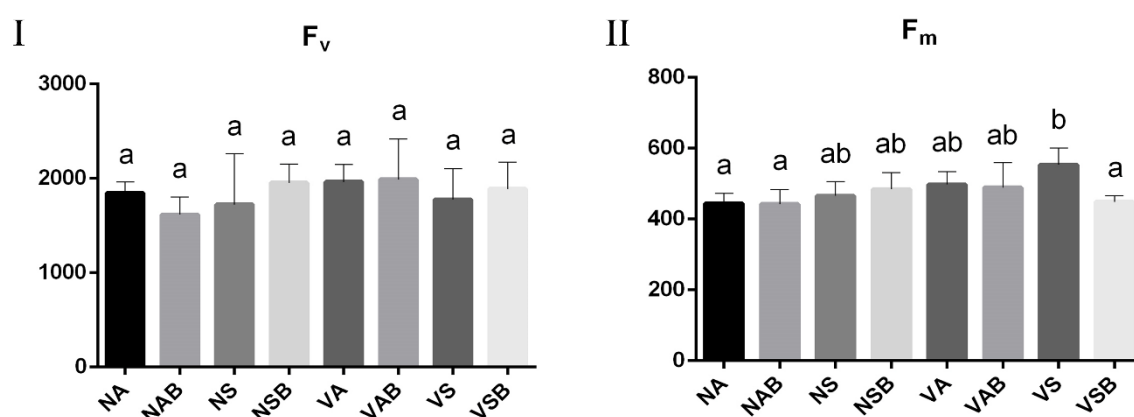


Figura 24 – Avaliação da fluorescência da clorofila em folhas de *A. deliciosa* cv. “Hayward”: **I** – Amplitude da fluorescência (F_v); **II** – Fluorescência máxima (F_m). NA – Plantas novas sem *B. subtilis*; NAB – Plantas novas assintomáticas com *B. subtilis*; NS – Plantas novas sintomáticas sem *B. subtilis*; NSB – Plantas novas sintomáticas com *B. subtilis*; VA – Plantas velhas sem *B. subtilis*; VAB – Plantas velhas com *B. subtilis*; VS – Plantas velhas sem *B. subtilis*; VSB – Plantas velhas sintomáticas com *B. subtilis*. As diferentes letras sobre cada condição indicam a existência de diferenças significativas ($p < 0,05$) entre estas, de acordo com o teste de Tukey HSD (one way ANOVA), e as barras de erro indicam o desvio padrão.

A eficiência máxima de PSII (F_v / F_m) não registou diferenças significativas, as plantas tratadas com *B. subtilis* apresentaram valores superiores, a exceção de NA que apresenta valores superiores a NAB (Fig. 25 I).

Na eficiência fotoquímica efetiva do PSII (F'_v / F'_m) não registou diferenças significativas, as plantas tratadas com *B. subtilis* apresentam valores superiores as não tratadas. Apesar de não se verificarem diferenças significativas é possível verificar uma diferença de 39,64% em VS e VSB e de 14,27% entre NS e NSB (Fig. 25 II).

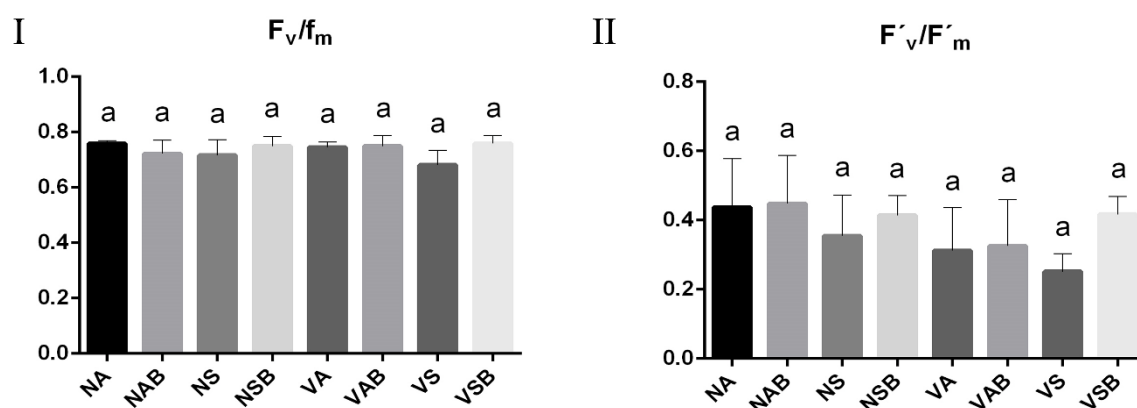


Figura 25 – Avaliação da fluorescência da clorofila em folhas de *A. deliciosa* cv. “Hayward”: **I** – Eficiência máxima de PSII (F_v / F_m); **II** – Eficiência fotoquímica efetiva do PSII (F'_v / F'_m). NA – Plantas novas sem *B. subtilis*; NAB – Plantas novas assintomáticas com *B. subtilis*; NS – Plantas novas sintomáticas sem *B. subtilis*; NSB – Plantas novas sintomáticas com *B. subtilis*; VA – Plantas velhas sem *B. subtilis*; VAB – Plantas velhas com *B. subtilis*; VS – Plantas velhas sem *B. subtilis*; VSB – Plantas velhas sintomáticas com *B. subtilis*. As diferentes letras sobre cada condição indicam a existência de diferenças significativas ($p < 0,05$) entre estas, de acordo com o teste de Tukey HSD (one way ANOVA), e as barras de erro indicam o desvio padrão.

As plantas novas apresentaram valores superiores às plantas velhas na taxa de transporte de elétrons (ETR), à exceção do VSB que apresentou o segundo valor mais alto. A condição VSB é 46,82% superior à VS (Valor mais baixo), contudo não foram registradas diferenças significativas (Fig. 26 I).

No fluxo excessivo de luz (PE) as condições tratadas com *B. subtilis* apresentam valores superiores as não tratadas, mas não se registam diferenças significativas (Fig. 26 II)

Na eficiência da dissipação não fotoquímica (ϕ_{NP}) as plantas velhas apresentam valores superiores em comparação com as novas, exceto o VSB que apresenta o segundo valor mais baixo. No entanto não se registaram diferenças significativas (Fig. 26 III).

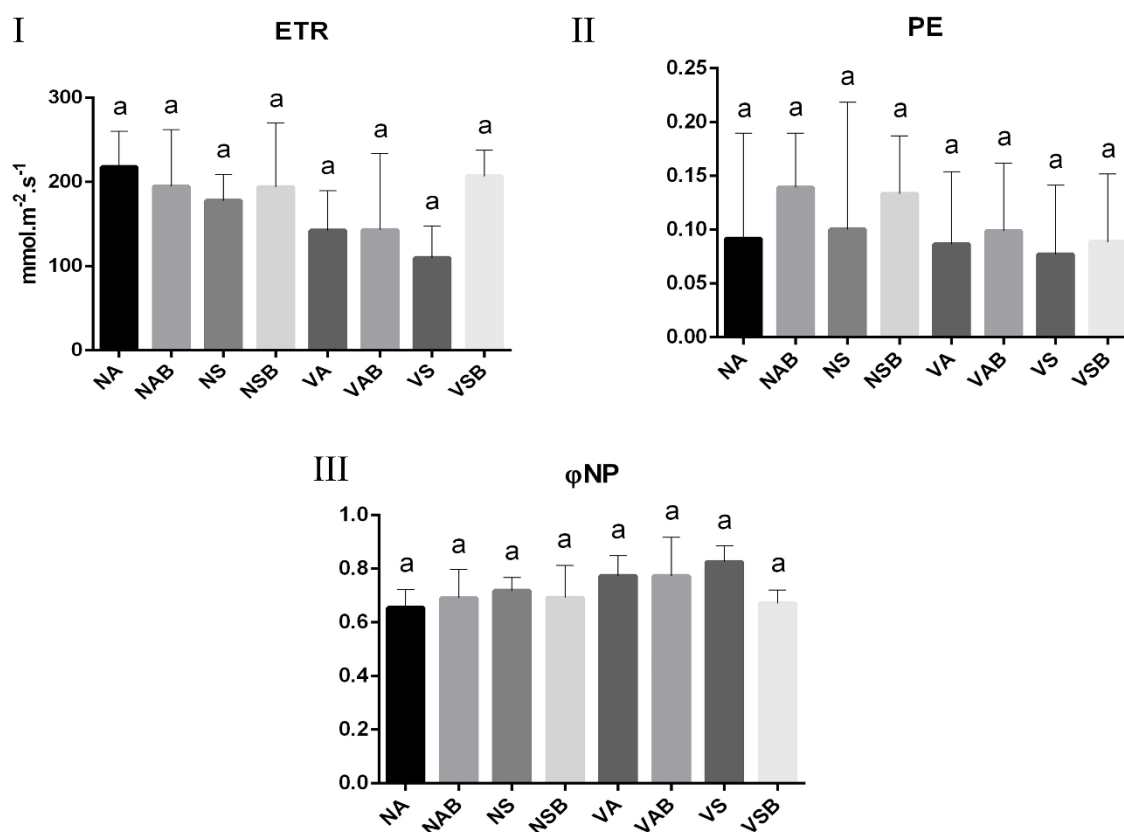


Figura 26 – Avaliação da fluorescência da clorofila em folhas de *A. deliciosa* cv. “Hayward”: **I** – Taxa de Transporte de elétrons (ETR); **II** – Fluxo excessivo de luz (PE); **III** – Eficiência da dissipação não fotoquímica (φNP). NA – Plantas novas sem *B. subtilis*; NAB – Plantas novas assintomáticas com *B. subtilis*; NS – Plantas novas sintomáticas sem *B. subtilis*; NSB – Plantas novas sintomáticas com *B. subtilis*; VA – Plantas velhas sem *B. subtilis*; VAB – Plantas velhas com *B. subtilis*; VS – Plantas velhas sem *B. subtilis*; VSB – Plantas velhas sintomáticas com *B. subtilis*. As diferentes letras sobre cada condição indicam a existência de diferenças significativas ($p < 0,05$) entre estas, de acordo com o teste de Tukey HSD (one way ANOVA), e as barras de erro indicam o desvio padrão.

3.3 Avaliação das trocas gasosas

Os valores obtidos de VSB, VAB e NAB apresentam os valores mais elevados na transpiração (E), com diferenças significativas em comparação ao VS que apresentou o valor mais baixo (Fig. 27 I).

Na condução estomática as condições NAB e VAB apresentam valores superiores (ambos maiores que 35%), com diferenças significativas, a NS (valor mais baixo). Em comparação as restantes condições não se verificam alterações significativas, contudo as plantas assintomáticas apresentam valores superiores (Fig. 27 II).

Na taxa de assimilação de CO₂ os valores obtidos por NAB, VAB e VA apresentam valores superiores (<40%), com diferenças significativas, em comparação ao NS que apresenta o valor mais baixo. Em comparação as restantes condições não se verificam alterações significativas, contudo as plantas assintomáticas apresentam valores superiores (Fig. 27 III).

Obtiveram-se valores superiores nas condições assintomáticas em comparação as sintomáticas, quer nas plantas novas como nas velhas, na razão fração molar de CO₂ intercelular/ fração molar de CO₂ ambiente. Contudo não se registaram diferenças significativas (Fig. 27 IV).

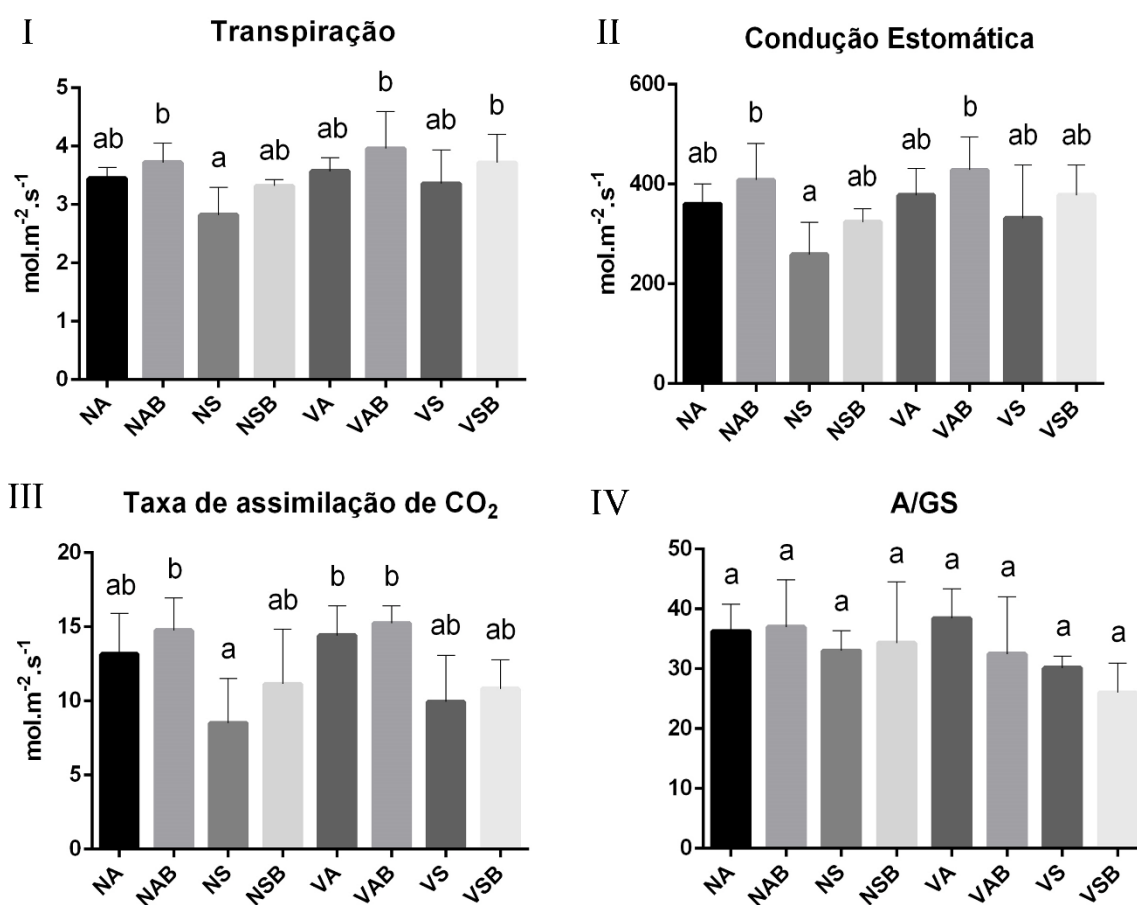


Figura 27 – Avaliação das trocas gasosas em folhas de *A. deliciosa* cv. “Hayward”: **I** – Transpiração (E) em mol por metro quadrado por segundo; **II** – Condução estomática (gs) em mol por metro quadrado por segundo; **III** – Taxa de assimilação de CO₂ (A) em mol por metro quadrado por segundo; **IV** – Eficiência intrínseca do uso da água (A/gS). NA – Plantas novas sem *B. subtilis*; NAB – Plantas novas assintomáticas com *B. subtilis*; NS – Plantas novas sintomáticas sem *B. subtilis*; NSB – Plantas novas sintomáticas com *B. subtilis*; VA – Plantas velhas sem *B. subtilis*; VAB – Plantas velhas com *B. subtilis*; VS – Plantas velhas sem *B. subtilis*; VSB – Plantas velhas sintomáticas com *B. subtilis*. As diferentes letras sobre cada condição indicam a existência de diferenças significativas ($p < 0,05$) entre estas, de acordo com o teste de Tukey HSD (one way ANOVA), e as barras de erro indicam o desvio padrão.

Razão fração molar de CO₂ intercelular/ fração molar de CO₂ ambiente registou valores superiores nas plantas sintomáticas, tratadas e não tratadas, não tendo sido verificadas diferenças significativas (Fig. 28).

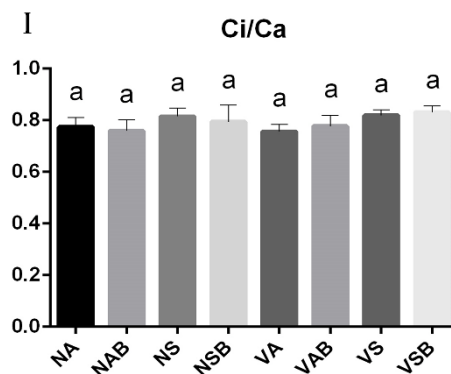


Figura 28 – I – Razão fração molar de CO₂ intercelular/ fração molar de CO₂ ambiente em folhas de *A. deliciosa* cv. “Hayward”. As diferentes letras sobre cada condição indicam a existência de diferenças significativas ($p < 0,05$) entre estas. NA – Plantas novas sem *B. subtilis*; NAB – Plantas novas assintomáticas com *B. subtilis*; NS – Plantas novas sintomáticas sem *B. subtilis*; NSB – Plantas novas sintomáticas com *B. subtilis*; VA – Plantas velhas sem *B. subtilis*; VAB – Plantas velhas com *B. subtilis*; VS – Plantas velhas sem *B. subtilis*; VSB – Plantas velhas sintomáticas com *B. subtilis*. As diferentes letras sobre cada condição indicam a existência de diferenças significativas ($p < 0,05$) entre estas, de acordo com o teste de Tukey HSD (one way ANOVA), e as barras de erro indicam o desvio padrão.

3.4 Quantificação da RuBisCo

A análise da RuBisCo demonstra que as plantas tratadas, tanto novas como velhas, apresentam valores superiores às não tratadas. As condições NSB e VAB apresentam os valores mais altos de RuBisCo e demonstram diferenças significativas com NA e VS (com os valores mais baixos) (Fig. 29).

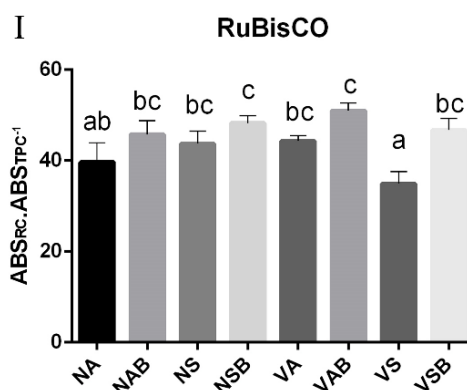


Figura 29 – I - Quantificação da RuBisCo em folhas de *A. deliciosa* cv. “Hayward”. As diferentes letras sobre cada condição indicam a existência de diferenças significativas ($p < 0,05$) entre estas. NA – Plantas novas sem *B. subtilis*; NAB – Plantas novas assintomáticas com *B. subtilis*; NS – Plantas novas sintomáticas sem *B. subtilis*; NSB – Plantas novas sintomáticas com *B. subtilis*; VA – Plantas velhas sem *B. subtilis*; VAB –

Plantas velhas com *B. subtilis*; VS – Plantas velhas sem *B. subtilis*; VSB – Plantas velhas sintomáticas com *B. subtilis*. As diferentes letras sobre cada condição indicam a existência de diferenças significativas ($p < 0,05$) entre estas, de acordo com o teste de Tukey HSD (one way ANOVA), e as barras de erro indicam o desvio padrão.

3.5 Quantificação de açúcares solúveis totais

As plantas sintomáticas apresentam valores superiores face às assintomáticas na análise dos açúcares totais. As condições de NS e NSB apresentam os valores mais altos, com diferenças significativas em relação às restantes condições em estudo, à exceção do VS, tendo sido possível verificar uma diferença significativa de 27,43% entre o NS e NA, e de 37,85% entre NSB e NAB (Fig. 30).

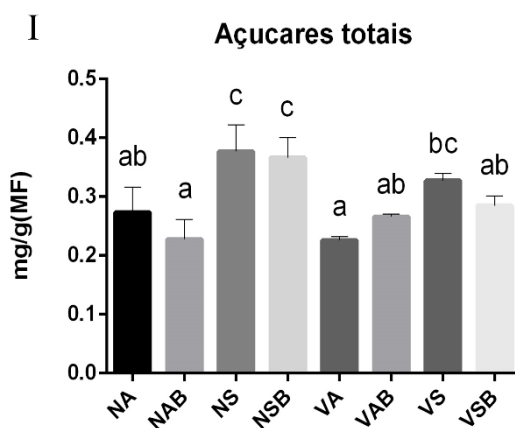


Figura 30 – I - Quantificação de açúcares totais em folhas de *A. deliciosa* cv. “Hayward”. NA – Plantas novas sem *B. subtilis*; NAB – Plantas novas assintomáticas com *B. subtilis*; NS – Plantas novas sintomáticas sem *B. subtilis*; NSB – Plantas novas sintomáticas com *B. subtilis*; VA – Plantas velhas sem *B. subtilis*; VAB – Plantas velhas com *B. subtilis*; VS – Plantas velhas sem *B. subtilis*; VSB – Plantas velhas sintomáticas com *B. subtilis*. As diferentes letras sobre cada condição indicam a existência de diferenças significativas ($p < 0,05$) entre estas, de acordo com o teste de Tukey HSD (one way ANOVA), e as barras de erro indicam o desvio padrão.

3.6 Quantificação de amido

Os resultados obtidos não demonstram diferenças significativas na quantificação de amido, contudo as plantas assintomáticas, excetuando NAB, apresentam valores superiores às sintomáticas. A condição NA apresenta um valor superior ao de NAB em 14,86%, e VA apresenta um valor inferior a VAB em 6,76%. É possível verificar uma diferença de 13,51% entre VA e VS. (Fig. 31)

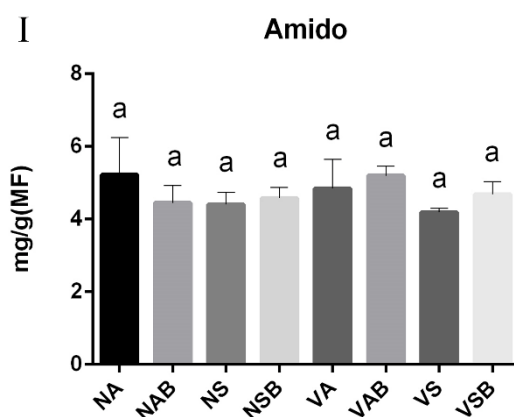


Figura 31 – I - Quantificação de Amido em folhas de *A. deliciosa* cv. “Hayward”. NA – Plantas novas sem *B. subtilis*; NAB – Plantas novas assintomáticas com *B. subtilis*; NS – Plantas novas sintomáticas sem *B. subtilis*; NSB – Plantas novas sintomáticas com *B. subtilis*; VA – Plantas velhas sem *B. subtilis*; VAB – Plantas velhas com *B. subtilis*; VS – Plantas velhas sem *B. subtilis*; VSB – Plantas velhas sintomáticas com *B. subtilis*. As diferentes letras sobre cada condição indicam a existência de diferenças significativas ($p < 0,05$) entre estas, de acordo com o teste de Tukey HSD (one way ANOVA), e as barras de erro indicam o desvio padrão.

3.7 Avaliação da qualidade dos frutos em 2017

Os parâmetros qualitativos dos frutos demonstraram que não foi significativa a interação entre o efeito da idade do pomar e da aplicação de Serenade Max® para nenhum dos parâmetros estudados. Os resultados dos efeitos principais da idade do pomar e da aplicação de Serenade Max® na qualidade dos frutos figuram no Quadro 6. A análise dos resultados obtidos demonstra que apenas existiram diferenças significativas ($p < 0.05$) para os valores dos sólidos solúveis totais SST (°Brix), as restantes condições em estudo não foram significativamente diferentes ($p < 0.05$).

Quadro 6 – Parâmetros qualitativos dos frutos avaliados em 2017. As diferentes letras sobre cada condição indicam a existência de diferenças significativas ($p < 0,05$) entre estas, de acordo com o teste t.

Parâmetros qualitativos do fruto	Pomar		Serenade Max®	
	Novo	Velho	Com	Sem
Diâmetro transversal (cm)	4,83 a	4,72 a	4,76 a	4,79 a
Diâmetro longitudinal (cm)	4,83 a	6,00 a	5,95 a	5,89 a
SST - °Brix (%)	10,50 b	9,52 a	10,23 a	9,78 a
Matéria seca (%)	17,53 a	17,55 a	17,56 a	17,51 a

Quadro 6 – (Continuação) – Parâmetros qualitativos dos frutos avaliados em 2017. As diferentes letras sobre cada condição indicam a existência de diferenças significativas ($p < 0,05$) entre estas, de acordo com o teste t.

Parâmetros qualitativos do fruto	Pomar		Serenade Max [®]	
	Novo	Velho	Com	Sem
Acidez titulável ($\text{g} \cdot 100\text{mL}^{-1}$)	1,67 a	1,63 a	1,63 a	1,67 a
Firmeza da polpa ($\text{kg} \cdot \text{mm}^{-2}$)	5,03 a	5,26 a	5,14 a	5,15 a
pH	3,11 a	3,00 a	3,07 a	3,04 a

4 Discussão

Os sintomas típicos, descritos por vários autores (Vanneste *et al.*, 2011d; Abelleira *et al.*, 2011; Everett *et al.*, 2011; Moura *et al.*, 2015), manifestam-se nas folhas, rebentos, necroses, troncos, ramos e gomos florais e apresentam um grande potencial de perda de produtividade (Vanneste, 2017). Pontuações necróticas nas folhas podem acabar por se juntar, formando necroses castanhas com uma maior dimensão (Moura, 2013), a bactéria induz um stress na planta, causando danos morfológicos visíveis, inibindo o seu desenvolvimento natural e contribuindo para uma diminuição da atividade fotossintética (Petriccione *et al.*, 2013). No entanto, o estado da arte no que se refere ao conhecimento das consequências fisiológicas no patossistema actínídea-Psa encontra-se ainda pouco explorado. Recentemente surgiram algumas abordagens nesse sentido com estudos de proteómica e transcriptómica que suportam o conhecimento sobre o estado fisiológico de plantas infetadas (Michelotti *et al.*, 2014; Wurms *et al.*, 2017; McAtee *et al.*, 2018; Wang *et al.*, 2018;) e, noutros casos, a produtividade dos pomares (Froud *et al.*, 2017). A ausência de informação sobre trocas gasosas em plantas de actínídea infetadas por Psa torna este trabalho inovador centrado na compreensão das consequências do patossistema foliar nas trocas gasosas, pigmentos e fluorescência da clorofila, utilizados como métodos para avaliar a performance da planta ao nível do metabolismo do carbono.

O estudo de Vaz (2017) permitiu, no mesmo pomar usado para este estudo, identificar 23 estirpes como Psa biovar 3, a mais agressiva e destrutiva. Assim todo este estudo está focado nas consequências e efeito dos tratamentos testados, relativamente à biovar mais agressiva de Psa.

As folhas de actínídea infetadas apresentam halos cloróticos evidente que podem progredir, e que indicam distúrbios ao nível da pigmentação fotossintética. As moléculas de clorofila têm um papel importante no processo de fotossíntese, seja pela absorção de energia luminosa, transferência de energia para os centros de reação, ou por levar à separação de carga nos centros de reação (Chen, 2014). Os resultados da análise de pigmentos obtidos no presente trabalho demonstrou que na presença da bactéria (plantas sintomáticas) há uma redução das clorofilas *a* e *b*. Em ambos os casos é possível observar que as plantas tratadas com *B. subtilis* apresentam uma maior produção de clorofilas, quer em plantas com ou sem sintomas, sendo exceção as VAB onde se obtiveram valores de produção nas clorofilas *a* e *b* mais baixos em comparação com VA com diferenças significativas ($p < 0.05$) na clorofila

b. O NAB apresenta os valores mais altos de produção de clorofila *a* e *b*, e NS, NSB e VS apresentam os mais baixos. O rácio clorofila *a/b* demonstra valores superiores nas plantas tratadas com *B. subtilis* à exceção de NAB, e os valores mais baixos são registados por VS e VA. Nestes parâmetros o VS destaca-se pelas baixas produções de clorofilas, o que pode indicar uma redução na performance fotossintética.

A redução geral das clorofilas *a* e *b* observada nas plantas infetadas com Psa está de acordo com o que sucede com outras bactérias patogénicas em diferentes espécies. Esta resposta pode indicar que um dos alvos das proteínas efetoras destas bactérias no hospedeiro são vias de biossíntese de pigmentos, nomeadamente as clorofilas. Assim, Berova *et al.* (2007) comparando cultivares de *Phaseolus vulgaris* infetadas com *Xanthomonas campestris* e *Pseudomonas syringae*, registaram decréscimos nas clorofilas *a* e *b*. Também Lobato *et al.* (2009, 2010) verificaram que cultivares de feijão infetadas com *Colletotrichum lindemuthianum* (raça 23 e raça 2047) apresentaram uma redução fotossintética testaram a reação de a e

Por outro lado, Baker *et al.* (2010) referem *P. syringae* pv. *tomato* DC3000 como capaz de estar envolvida nos mecanismos de degradação das clorofilas. Contudo, Rojas *et al.* (2014) salientam que a redução de pigmentos pode ser consumada em virtude de uma complexa alteração no metaboloma primário da planta de forma a reduzir a taxa fotossintética e por outro lado a estimular vias de defesa em resposta ao patossistema bactéria-hospedeiro.

As plantas assintomáticas de actinídea apresentaram valores mais elevados de carotenoides relativamente às sintomáticas, tratadas e não tratadas com *B. subtilis*. Tal como verificado para as clorofilas *a* e *b*, VS também apresenta o valor mais baixo, o que pode indicar um défice na absorção de luz solar que poderá reduzir substancialmente a capacidade de fotoproteção destas folhas. NAB apresenta os valores mais elevados tal como também se verificou nas clorofilas *a* e *b* o que poderá indicar que na ausência da bactéria se obtêm melhores resultados na absorção da energia excessiva. Resultados anteriormente obtidos por vários autores (Daurelio *et al.*, 2015) mostraram que plantas de *Citrus sinensis* infetadas com a bactéria *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* apresentaram uma diminuição no teor de carotenoides o mesmo se tendo verificado em *Solanum lycopersicum* infetado com o vírus do mosaico do pepino (Hanssen *et al.*, 2011). Estes resultados estão de acordo com os obtidos no presente estudo parPsa/actinidia, indicando que a patogenicidade e a virulência parecem reduzir (por inibição das vias ou por degradação) o teor em carotenoides.

As plantas sintomáticas de actínídea apresentaram uma produção de antocianinas maior do que nas plantas assintomáticas, à exceção de VSB que apresenta um valor inferior a VAB. O tratamento com *B. subtilis* conduziu a valores inferiores em relação às plantas não tratadas. Os resultados descritos por Gutha *et al.*, (2010) mostram que folhas de videira com sintomas do vírusdo enrolamento das folhas da videira (GLRaV-3) apresentaram uma coloração avermelhada associada ao aumento de classes específicas de antocianinas (crisantemina, peonidina e crisantemina) que em circunstâncias normais (assintomáticas) não se verificariam Este aumento de pigmentos também foi igualmente descrito por outros autores (De La Fuente *et al.*, 2013), relativamente a plantas infetadas com *Xylella fastidiosa* . Esta resposta é descrita como um mecanismo de defesa do hospedeiro contra infeções de agentes patogénicos (Freeman and Beattie, 2008) o que está de acordo com o observado na condição NS do presente estudo. Possivelmente as plantas do pomar novo apresentam uma resposta mais efetiva em resposta à presença da bactéria e desta forma, possivelmente poderão apresentar uma maior resistência à infeção.

A análise da fluorescência da clorofila não demonstrou alterações significativas na eficiência do PSII (Φ PSII), contudo VSB apresentou um valor bastante superior a VS com uma diferença de 46,84%. Na F_v / F_m não se registaram diferenças significativas, no entanto NS apresentou um valor inferior a NSB e observou-se uma diferença de 10,25%, estando os valores obtidos entre as condições entre 0,68 e 0,76. Apesar de não se terem verificado diferenças significativas na razão F_v / F_m foi possível verificar que na fluorescência máxima (F_m), VS apresenta um valor superior a VSB com uma diferença significativas de 18,92%. Montanaro *et al.* (2007) avaliaram a resposta do mecanismo fotossintético de actínídea nas condições mediterrâneas e verificaram que a eficiência máxima de PSII atingiu valores de 0,79 no início da manhã e de 0,60 ao meio dia, com resultados que sugerem que o PSII é parcialmente inativado durante os períodos mais quentes do dia (temperatura do ar de 34 °C). A diminuição de F_v / F_m é um bom indicador dos danos da fotoinibição causados pela luz quando as plantas são submetidas a stresses ambientais (Sayar *et al.*, 2008). Rajendran *et al.* (2016) avaliaram a progressão da infeção de *Pseudomonas cichorii* em tomateiros e obtiveram resultados que demonstram uma redução significativa de F_v / F_m e Φ PSII nas folhas com as concentrações mais altas da bactéria ($\geq 10^8$ cfu/ml) durante os três primeiros dias após inoculação, que correspondem a diferenças no desenvolvimento de sintomas. Neste ensaio do kiwi, à exceção de NAB, as condições tratadas com *B. subtilis* apresentaram valores médios superiores às plantas não tratadas com a mesma idade, embora não

significativos ($p > 0.05$), tal como nas plantas adaptadas à luz (F_v'/F_m') onde o potencial fotossintético não variou significativamente. Samaniego-Gámez *et al.* (2016) testou sementes de *Capsicum chinense* Jacq. inoculadas com *Bacillus cereus* (K46) e *Bacillus spp.* (M9; uma mistura de *B. subtilis* e *B. amyloliquefaciens*), verificando que as plantas inoculadas com *Bacillus* apresentavam valores superiores de F_v / F_m em comparação ao controlo. Contudo esses efeitos promissores do uso de *Bacillus spp.* para mitigar o efeito de bactérias patogénicas no potencial fotossintético não foi verificado no pomar de actínídea analisado.

A análise das trocas gasosas nos parâmetros da transpiração (E), condução estomática (gs) e a taxa de assimilação de CO_2 (A) demonstraram que as plantas tratadas com *B. subtilis* apresentam valores superiores em relação às plantas assintomáticas/sintomáticas, à exceção de VSB para gs e E. Por outro lado, as plantas NS apresentam valores significativamente inferiores para os parâmetros anteriormente referidos, demonstrando assim que plantas novas (<6 anos) poderão ser mais suscetíveis à bactéria, ou por outro lado, como demonstrado por Montes (2017), estes fatores possam ser um mecanismo de resistência e proteção que serve de barreira à entrada da bactéria. O mesmo autor verificou que o composto (Z)-3-hexanol que é produzido em plantas de tomate em resposta à infeção por *Pseudomonas syringae* DC3000 (López-Gresa *et al.*, 2017) assume um papel crucial na defesa da planta através de duas vias, uma direcionada para o fecho estomático para funcionar como barreira defensiva contra a entrada de PsDC3000 e outra por via do seu efeito antimicrobiano. Nesse estudo foi ainda verificada a redução significativa da população de PsDC3000 com a aplicação do composto (Z)-3-hexanol, e como consequência menores danos nas plantas.

No presente trabalho, a presença de menores danos nas plantas novas face às velhas foi visualmente perceptível em condições de campo na altura do ensaio, no entanto, a incidência e severidade da doença não foi avaliada em condições de campo. Contudo, estas observações poderao indicar uma maior resistência das plantas novas a infeções por Psa, por poderem possuir vias de defesa mais ativadas do que nas plantas velhas, que poderão, tal com refere Marin *et al.* (2014) er um impacto energético elevado nas plantas, uma vez que se observou está a reduzir a performance fotossintética destas plantas. Resultados obtidos por Bispo *et al.* (2016) em folhas de cultivares de manga infetadas com *Ceratocystis fimbriata*, mostraram decréscimos nos parâmetros de A, E, gs e C_i/C_a . Estes estudos apontam para a

mesma vertente de que as bactérias fitopatogénicas, como Psa em *A. deliciosa* está a provocar danos ao nível das trocas gasosas e assim adstringir os potenciais fotossintético e fotoquímico das plantas.

A quantificação da RuBisCO demonstrou que as plantas tratadas com *B. subtilis*, nomeadamente NSB e VAB apresentam valores superiores às não tratadas, em que VS apresentou o valor mais baixo e apresentou uma diferença significativa face a VSB. Ao comparar plantas novas e velhas verificou-se que as plantas novas sintomáticas apresentaram um conteúdo em RuBisCO superior às plantas velhas. Nas plantas velhas o tratamento com *B. subtilis* em plantas sintomáticas pode representar um fator de mitigação face à quebra significativa do conteúdo em RuBisCO (tendo em conta os valores de referência da condição VA). Este possível efeito de mitigação poderá contribuir para um uso eficiente do carbono por parte da planta. No entanto, para além dum efeito de mitigação, um efeito de estímulo parece estar associado de uma forma genérica ao uso de *B. subtilis*, uma vez que é verificado um aumento do conteúdo em RuBisCO para quase todos os tratamento com este produto, nomeadamente NSB e VAB. Tang *et al.* (1996) testaram o efeito de *Albugo candida* sobre *Arabidopsis thaliana* na fotossíntese e no metabolismo de carbono, obtendo resultados de uma diminuição da atividade de RuBisCO ao decimo quarto dia após inoculação de 50% comparativamente às com as plantas controlo. Em ambiente controlado verificou-se que *Lolium arundinaceum* (Schreb.) Darbysh. infetado com *Neotyphodium coenophialum* (Morgan-Jones and Gams) apresentou valores da atividade da RuBisCO superior nas plantas não infetadas, contudo nos rácios fotossintéticos (C_i / C_a) apresentara valores inferiores em comparação as plantas infetadas (Swarthout *et al.*, 2009). Estes estudos parecem estar de acordo com os obtidos no presente estudo, uma vez que foi verificado um decréscimo do conteúdo em RuBisCO relativamente à condição infetada VS. Assim, estes resultados parecem demonstrar uma clara interferência de Psa na RuBisCO, o que parece estar de acordo com o efeito para outras bactérias fitopatogénicas em outras espécies de plantas. No entanto, o fator diferencial aparenta ser o tratamento que mitiga ou estimula a quantidade de RuBisCO em plantas infetadas.

As análises dos AST demonstraram existir diferenças entre as plantas sintomáticas e assintomáticas, tanto nas novas como nas velhas, à exceção de VAB e VSB, sendo que plantas sintomáticas apresentam o valor médio superior às não sintomáticas. Desta forma, os resultados demonstram que a presença da bactéria nos tecidos vegetais é um fator para o

aumento da concentração dos AST nas folhas. El-Khallal (2007) obteve resultados de AST superiores em folhas de tomateiro infetadas com *Fusarium oxysporum*, comparando o efeito dos tratamentos de uma micorriza arbuscular, ácido salicílico e ácido jasmonico. No final de 42 dias após a inoculação do fungo observou que as plantas controle apresentavam os resultados mais baixos de AST, as plantas apenas inoculadas com a bactéria e tratadas com cada um dos tratamentos individualmente apresentavam valores superiores. Contudo, a combinação da micorriza com cada uma das hormonas apresentaram valores superiores. Estes resultados revelaram uma acumulação de açúcares solúveis em plantas de tomateiro infetadas, especialmente nas tratadas, indicando uma relação entre a regulação das vias metabólicas e concentração de açúcares e a resistência sistémica. A aplicação de exopolissacáridos produzidos por *Pseudomonas spp.* aumentaram a produção de açúcares solúveis em plantas de milho sob stress hídrico em relação a plantas não inoculadas, podendo indicar que *Pseudomonas spp.* ajuda na hidrólise do teor de amido, que posteriormente disponibiliza mais açúcar para ajuste osmótico para atenuar o efeito do stress hídrico (Nassem & Bano, 2014). Este aumento de AST foliares verificados no ensaio de Psa em *A. deliciosa* parece estar em concordância com os estudos referidos.

O aumento de açúcares num patossistema estabelecido sugere dois prismas: a) Psa está a manipular o metabolismo primário da planta através das suas proteínas efetoras de forma a coordenar o transporte de açúcares para o patossistema como condição requerida para o seu ótimo crescimento; b) Acumulação foliar de açúcares, no patossistema, para regular mecanismos de defesa autoimunes contra Psa. A primeira abordagem está assente no que são os requisitos da bactéria para um ótimo desenvolvimento e propagação. Por exemplo, Hirano e Upper (2000) demonstram que a maior concentração de açúcares é determinante para a obtenção de uma população mais numerosa de *Pseudomonas syringae*. Por outro lado, tendo em conta a segunda perspetiva fisiológica da planta, com a redução da performance fotossintética, induzida pela infeção, e por consequência menor produção de fotoassimilatos, a planta reage perante esse cenário iniciando o transporte de açúcares para as regiões afetadas (Roitsch *et al.*, 2003). A sacarose apoplástica é aumentada pela infeção acompanhada por um aumento da atividade da invertase que cliva a sacarosa apoplástica em glucose e frutose, as quais são transportadas na célula pelos transportadores de hexoses que vão fornecer os requisitos de energia para a atividade de resistência da planta (Bolton, 2009). Contudo o papel dos açúcares no patossistema parece ser ainda mais extenso que as funções da imunidade das plantas, e o fornecimento de energia. Estes são sequestrados no apoplasto

para inibir a atividade do sistema de secreção do tipo 3 (T3SS) (Nobori *et al.*, 2018). Em *Populus* spp. infetados com *Melampsora* spp., um género de bactérias patogénicas de plantas, alteram o metabolismo dos açúcares e a translocação com o aumento da expressão de transportadores de açúcar para aumentar a sua concentração nos tecidos afetados, de forma a atuarem no mecanismo de defesa da planta em resposta ao patógeno (Major *et al.*, 2010).

A concentração total em amido teve como valor médio mais elevado o NA e o mais baixo em VS, sem se registarem diferenças significativas. Garmendia *et al.* (2004) estudaram o efeito da micorriza arbuscular (*Glomus deserticola*) em plantas de pimenta infetadas com *Verticillium dahliae*. Os resultados obtidos demonstraram que o teor de amido diminuiu à medida que as folhas envelheciam, independentemente da presença ou não do patógeno. Contudo o teor de amido das plantas sem a presença da micorriza diminuiu quando foram inoculadas com o patógeno, sendo que as reduções de amido foram concomitantes com aumentos em AST. Os mesmo autores, num estudo anterior, mostraram que o aumento de AST em folhas inoculadas com *V. dahliae* estava relacionado com a hidrólise do amido (Goicoechea *et al.*, 2000). No entanto a interação de Psa com a *A. deliciosa* não afetou significativamente este parâmetro, o que poderá ter ocorrido pela utilização de outras fontes de carbono por parte da planta para participar na defesa contrPsa.

Para compreender os efeitos de Psa e do tratamento com *B. subtilis* na qualidade dos frutos relativamente às alterações observadas no metabolismo do carbono, foram avaliados parâmetros qualitativos do kiwi. Os parâmetros qualitativos dos frutos apenas demonstraram diferenças ao nível do °Brix, maior nos frutos do pomar novo, resultados que são idênticos aos descritos por Vaz *et al.* (2018b) no mesmo pomar para a campanha de 2016. Prencipe *et al.* (2016) apresentaram resultados idênticos para a acidez titulável e sólidos solúveis totais em plantas infetadas com Psa. Um dos fatores que poderá contribuir para que a qualidade dos frutos não se altere, é o facto dos frutos de kiwi não serem diretamente infetados por Psa (Gao *et al.*, 2016). Contudo, Prencipe *et al.* (2016) referem que a qualidade dos frutos durante o armazenamento do kiwi fica comprometida, devido à presença de Psa no pomar, tendo os frutos um prazo de armazenamento mais curto devido à maior suscetibilidade a podridões (particularmente *Botritis cinerea*).

5 Conclusões

A análise do metabolismo do carbono em *A. deliciosa* (cv. “Hayward”) infetada com Psa3 em condições de campo é reportada neste trabalho pela primeira vez, envolvendo dados de fluorescência e trocas gasosas suportados também por ensaios bioquímicos complementares. De facto, esta é uma componente fundamental para o desenvolvimento e produção vegetal que poderá fornecer dados relevantes à compreensão do patossistema actinidia-Psa, performance das plantas infetadas e sobre a avaliação de um tratamento biológico com uma bactéria antagonista, *B. subtilis*.

Este trabalho demonstrou que Psa afeta a performance do metabolismo do carbono da *A. deliciosa* cv. “Hayward” ao nível dos pigmentos e das trocas gasosas. A nível de pigmentos poderá estar a afetar absorção de energia luminosa, transferência de energia para os centros de reação, ou por levar à separação de carga nos centros de reação, e no metabolismo de carbono poderá estar a adstringir os potenciais fotossintético e fotoquímico das plantas.

É possível verificar uma alteração na regulação estomática das plantas, embora este possa ser um mecanismo de defesa que funciona com um escudo de proteção da planta minimizando a entrada de Psa. Deste modo reduz a possibilidade de infeção através das fontes de inóculo dispersas nos pomares de populações epífíticas de Psa. O maior encerramento estomático reduz a performance fotossintética.

Nas plantas sintomáticas o uso de *B. subtilis* induz o efeito de mitigação, sendo muitas vezes um estímulo para o aumento da performance do metabolismo de carbono. Assim, comprovando a eficácia deste produto na manutenção da performance do metabolismo do carbono nas plantas infetadas.

Aparentemente o teor de açúcares terá um papel fundamental na defesa da planta contra Psa uma vez que a planta responde à presença do patógeno, podendo aumentar o transporte de açúcares para as regiões infetadas de modo a poder fornecer os requisitos de energia para a atividade de resistência da planta. Além do papel de fornecimento de energia poderão ainda inibir o sistema de secreção do tipo 3, o qual Psa possui e utiliza na interação patógeno-hospedeiro.

O factor idade das plantas não parece conferir uma vantagem competitiva na performance do metabolismo do carbono de plantas de actinidia quando comparadas entre os grupos de plantas sintomáticas e assintomáticas.

No futuro, um estudo mais alagado ao nível da transcriptómica e metabolómica do patossistema seria essencial para melhor compreender os mecanismos da suscetibilidade e defesa da planta face a infeções causadas por Psa, através de dados do metabolismo primário e secundário.

No momento da colheita, os parâmetros qualitativos dos frutos não foram alterados o que é um fator relevante, considerando-se importante avaliar futuramente a qualidade dos frutos durante a conservação (pós-colheita) e avaliar a produtividade das plantas, para assim inferir mais adequadamente sobre as relações do metabolismo do carbono. Será também importante avaliar o efeito da idade das plantas e do tratameto com *B. subtilis* na produtividade, de forma a conhecer as perdas causadas pela bactéria e avaliar a eficácia do tratamento biológico, para desta forma fornecer à comunidade científica e aos produtores dados sobre o impacto económico resultante.

Bibliografia

- Abelleira, A., Ares, A., Aguin, O., Peñalver, J., Morente, M. C., López, M. M., Sainz, M. J. & Mansilla, J. P. (2015). Detection and characterization of *Pseudomonas syringae* pv. *actinidifoliorum* in kiwifruit in Spain. *Journal of Applied Microbiology*, 119(6), pp. 1659–1671. DOI: 10.1111/jam.12968.
- Abelleira, A., Ares, A., Aguin, O., Picoaga, A., López, M. M. & Mansilla, P. (2014). Current situation and characterization of *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* on kiwifruit in Galicia (northwest Spain). *Plant Pathology*, 63, pp. 691–699. DOI: 10.1111/ppa.12125.
- Abelleira, A., López, M., Peñalver, J., Aguin, O., Mansilla J. P., Picoaga, A. & García, M. J. (2011). First report of bacterial canker of kiwifruit caused by *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* in Spain. *Plant Disease* 95 (12), 1593 p. DOI: 10.5423/PPJ.RW.01.2017.0021.
- Agrimm (2018). KiwiWax. Disponível no site Agrimm.co.Nz., URL: <http://agrimm.co.nz/-portfolio-items/kiwivax/>. Consultado a 20 de outubro de 2018.
- Alves, A. A., Chaves, A., DaMatta, F. M. e Alfenas, A. C. (2011). Leaf gas exchange and chlorophyll a fluorescence of *Eucalyptus urophylla* in response to *Puccinia psidii* infection. *Acta Physiologiae Plantarum*, 9p. DOI: 10.1007/s11738-011-0722-z.
- Associação Portuguesa de Kiwicultores. (2007). Manual do Kiwicultor, 160 pp.
- Baker, C. M., Chitrakar, R., Obulareddy, N., Panchal, S., Williams, P. and Melotto, M. (2010). Molecular battles between plant and pathogenic bacteria in the phyllosphere. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 43(8), pp. 698–704.
- Baker, N. R. (2008). Chlorophyll Fluorescence: A Probe of Photosynthesis In Vivo. *Annual Review of Plant Biology*, 59, pp. 89–113. DOI: 10.1146/annurev.arplant.59.032607.092759.
- Balestra G. M., Buriani G., Cellini A., Donati I., Mazzaglia A. & Spinelli, F. (2018). First report of *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* on kiwifruit pollen from Argentina. *Plant Disease* 102(1), p 237. DOI: 10.1094/PDIS-04-17-0510-PDN.

- Balestra G. M., Renzi, M. & Mazzaglia, A. (2010). First report of bacterial canker of *Actinidia deliciosa* caused by *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* in Portugal. New Disease Reports 22, 10 pp. DOI: 10.5197/j.2044-0588.2010.022.010.
- Balestra, M., Mazzaglia, A., Quattrucci, A., Renzi, M. & Rossetti, A. (2009). Occurrence of *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* in Jin Tao kiwi plants in Italy. Phytopathology Mediterr. 48, pp. 299–301. DOI: 10.14601/Phytopathol_Mediterr-2821.
- Bastas, K. K. & Karakaya, A. (2012). First report of bacterial canker of kiwifruit caused by *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* in Turkey. Plant Disease 96(3), 452. DOI: 10.1094/PDIS-08-11-0675
- Berger, S., Benediktyová, Z., Matouš, K., Bonfig, K., Mueller., M. J., Nedbal, L and Roitsch, T. (2007). Visualization of dynamics of plant–pathogen interaction by novel combination of chlorophyll fluorescence imaging and statistical analysis: differential effects of virulent and avirulent strains of *P. syringae* and of oxylipins on *A. thaliana*. Journal of Experimental Botany, Vol. 58, No. 4, pp. 797–806. DOI: 10.1093/jxb/erl208.
- Berova, M., Stoeva, N., Zlatev, Z., Stoilova, T., Chavdarov, P. (2007). Physiological changes in bean (*Phaseolus vulgaris* L.) leaves, infected by the most important bean disease. Journal of Central European Agriculture 8, pp. 57-62.
- Bispo, W. M. S., Araújo, L., Moreira, W. R., Silva, L. C., and Rodrigues, F. A. (2016). Differential leaf gas exchange performance of mango cultivars infected by different isolates of *Ceratocystis fimbriata*. Scientia Agricola, (Piracicaba, Braz.) vol.73 no.2, pp. 150-158. DOI: 10.1590/0103-9016-2015-0022.
- Bolton, M. D. (2009). Primary metabolism and plant defense--fuel for the fire. Molecular Plant-Microbe Interactions, vol. 22, No. 5, pp. 487–497. DOI: 10.1094/MPMI-22-5-0487.
- Bradford, M. M. (1976). A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. Analytical biochemistry 72, pp. 248-254. DOI: 10.1016/0003-2697(76)90527-3.
- Bull, C.T., De Boer, S.H., Denny, T.P., Firrao, G., Saux, M.F.L., Saddler, G.S., Scortichini, M., Stead, D.E. and Takikawa, Y. (2010). Comprehensive list of names of plant

- pathogenic bacteria, 1980-2007. *Journal of Plant Pathology*, 92, pp. 551-592. DOI: 10.4454/jpp.v92i3.302.
- Burdon, J. & Lallu, N. (2011). Kiwifruit (*Actinidia* spp.). In *Postharvest biology and technology of tropical and subtropical fruits*, Vol. 3: Cocona to mango., Eds. Yahia, E. M., Elsevier, 326-343.
- Butler, M. I., Stockwell, P. A., Black, M. A., Day, R. C., Lamont, I. L. and Poulter, R. T. M. (2013). *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* from recent outbreaks of kiwifruit bacterial canker belong to different clones that originated in China. *PloS one*, 8.
- Buttimer, C., Mcauliffe, O., Ross, R. P., Hill, C., Mahony, J. O., Coffey, A. and Chan, B. K. (2017). Bacteriophages and Bacterial Plant Diseases. *Frontiers in Microbiology*, 8:34, 1–15. DOI: 10.3389/fmicb.2017.00034.
- Cacioppo (1989). O cultivo do quivi. Editorial Presença, Lisboa, 123p.
- Cameron, A., & Sarojini, V. (2014). *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae*: Chemical control, resistance mechanisms and possible alternatives. *Plant Pathology*, 63(1), pp. 1–11. DOI: 10.1111/ppa.12066.
- Cameron, A., Zoysa, G. H. & Sarojini, V., (2014). Antimicrobial peptides against *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* and *Erwinia amylovora*: Chemical synthesis, secondary structure, efficacy, and mechanistic investigations. *Biopolymers*, 102, 1, pp. 88–96. DOI: 10.1002/bip.22423.
- Carneiro, R. M. D. G., Randig, O., M. R. A., Almeida & Gomes, A. C. M. M. (2004). Additional information on *Meloidogyne ethiopica* whitehead, 1968 (Tylenchida: Meloidogynidae), a root-knot nematode parasitising kiwi fruit and grape-vine from Brazil and Chilei. *Nematology*, 6: 109–123. DOI: 10.1163/156854104323072982.
- Chapman, J. R., Taylor, R. K., Weir, B. S., Romberg, M. K., Vanneste, J. L., Luck, J., & Alexander, B. J. R. (2012). Phylogenetic relationships among global populations of *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae*. *Phytopathology*, 102(1992), pp. 1034–44. DOI: 10.1094/PHYTO-03-12-0064-R.
- Chen, H., Hu, Y., Qin K., Yang X., Jia Z., Li Q., Chen H. and Yang H. (2018). A serological approach for the identification of the effector hopz5 of *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae*: a tool for the rapid immunodetection of kiwifruit bacterial canker. *Journal*

- of Plant Pathology, Vol. 100, Issue 2, pp. 171-177. DOI: 10.1007/s42161-018-0041-y.
- Chen, M. (2014). Chlorophyll modifications and their spectral extension in oxygenic photosynthesis. *Annual Review of Biochemistry* 83, pp. 317–340. DOI: 10.1146/annurev-biochem-072711-162943.
- Cheng, H., Lj, Y., Wan, S., Zhan, J., Ping, Q., Guo, L. and Jiahua, X. (1995). Pathogenic identification of kiwifruit bacterial canker in Anhui. *Journal of Anhui Agricultural University*, 22, 219–223.
- Corral, C. S., Casa, O. A. & Fernández, P. V. (1996). Fenología y frutificación de la *Actinidia deliciosa* en la provincia de Pontevedra (NW_Espanha). I Simposio Europeo de Aerobiología, Santiago de Compostela, 11-13 septiembre. Disponível no URL: <http://www.efa-dip.org/comun/publicaciones/posters/antes/1996%20Santiago/-Feno%20kiwi%20aero.pdf>. Consultado a 10 de outubro de 2018.
- Costa, J. (2008). 16. Nemátodes. In *Kiwi Da produção à comercialização*, Antunes, M. D. (Eds.), Ciências da Terra, Universidade do Algarve, pp. 154-156.
- Courteny, D. and Ward, C. (2013). Chapter 1: Kiwifruit: taking its place in the global fruit bowl. In *Advances in Food and Nutrition Research*, Elsevier, inc., Volume 68, pp. 1-14.
- Cunty, A., Cesbron, S., Poliakov, F., Jacques, M. A., & Manceau, C. (2015). Origin of the outbreak in France of *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* biovar 3, the causal agent of bacterial canker of kiwifruit, revealed by a multilocus variable-number tandem-repeat analysis. *Applied and Environmental Microbiology*, 81(19), pp. 6773–6789. DOI: 10.1128/AEM.01688-15.
- Cunty, A., Poliakov, F., Rivoal, C., Cesbron, S., Fischer-Le Saux, M., Lemaire, C., Jacques, M. a., Manceau, C. and Vanneste, J. (2014) - Characterization of *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* (Psa) isolated from France and assignment of Psa biovar 4 to a de novo pathovar: *Pseudomonas syringae* pv. *Actinidifoliorum* pv. nov. *Plant Pathology*, pp. 1–15. DOI: 10.1111/ppa.12297
- Dan Tatagiba, S., DaMatta, F. M., e Rodrigues, F. Á. (2015). Leaf gas exchange and chlorophyll a fluorescence imaging of rice leaves infected with *Monographella*

- albescens*. *Phytopathology*, 105(2), pp. 180-188. DOI: 10.1094/PHYTO-04-14-0097-R.
- Datson, P.M. and Ferguson, A.R. (2011). Chapter 1 Actinidia. In *Wild Crop Relatives: Genomic and Breeding Resources Tropical and Subtropical Fruits*, Kole, Chittaranjan (Eds.), Springer Heidelberg Dordrecht London New York, pp. 1-20.
- Daurelio, L. D., Tondo, M. L., Soledad Romero, M. S., Merelo, P., Cortadi, A. A., Talón, M., Tadeo, F. R., Orellano, E. G. (2015). Novel insights into the *Citrus sinensis* nonhost response suggest photosynthesis decline, abiotic stress networks and secondary metabolism modifications. *Functional Plant Biology*, 42, pp. 758–769. DOI: 10.1071/FP14307.
- De La Fuente, L., Parker, J. K., E. Oliver, J. E., Granger, S., Brannen, P. M., van Santen, E., Cobine, P. A. (2013). The Bacterial Pathogen *Xylella fastidiosa* Affects the Leaf Ionome of Plant Hosts during Infection. *Cognitive Development* 22, pp. 33–46. DOI: 10.1371/journal.pone.0062945.
- DGAV (Direção Geral de Alimentação e Veterinária) (2018). Lista de produtos autorizados para usos menores. Site disponível DGAV, URL: <http://www.agromanual.pt/doc/USOS%20MENORES%202018.pdf>. Consultado a 29 de outubro.
- DGAV (Direção Geral de Alimentação e Veterinária) (2018). Registo e Emissão do Passaporte Fitossanitário Guia do Operador económico. Ministério da Agricultura, Florestas e Desenvolvimento Rural, Direção de Serviços de Sanidade Vegetal Divisão de Inspeção Fitossanitária e de Materiais de Propagação Vegetativa Lisboa, 8ª edição, 74p.
- Di Marco, S., Calzarano, F., Gams, W. and Cesari, A. (2000). A new wood decay of kiwifruit in Italy. *New Zealand Journal of Crop and Horticultural Science*, 28:1, pp. 69-72. DOI: 10.1080/01140671.2000.9514124.
- Di Marco, S., Calzarano, F., Osti, F., Mazzullo, A. (2004). Pathogenicity of fungi associated with a decay of kiwifruit. *Australasian Plant Pathology*, 33, pp. 337–342. DOI: 10.1071/AP04024.
- Dias, M. C., Pinto, G., Correia, C. M., Moutinho-Pereira, J., Silva S., & Santos, C. (2013). Photosynthetic parameters of *Ulmus* minor plantlets affected by irradiance during

- acclimatization. *Biologia plantarum*, 57(1), 33-40. DOI: 10.1007/s10535-012-0234-8.
- Dreo, T., Pirc, M., Ravnkar, M., Zezlina, I., Poliakoff, F., Rivoal, C., Nice, F. and Cuntz, A. (2014). First report of *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae*, the causal agent of bacterial canker of kiwifruit in Slovenia. *Plant Disease*, The American Phytopathology Society, 98, 1578. DOI: 10.1094/PDIS-05-14-0513-PDN.
- Driever, S. M., Lawson, T., Andralojc, P. J., Raines, C. A. and Parry, M. A. J. (2014). Natural variation in photosynthetic capacity, growth, and yield in 64 field-grown wheat genotypes. *Journal of Experimental Botany*, 65(17), pp. 4959–4973. DOI: 10.1093/jxb/eru253
- Dunn, S. T. (1911). A revision of the genus *Actinidia*, Lindl. *Journal of the Linnean Society of London*, 39, pp. 394–410. DOI: 10.1111/j.1095-8339.1911.tb02326.x.
- Earl, A.M., Losick, R. and Kolter, R. (2008). Ecology and genomics of *Bacillus subtilis*. *Trends Microbiol.* 16, pp. 269-275. DOI: 10.1016/j.tim.2008.03.004.
- El-Khallal, S. M. (2007) Induction and Modulation of Resistance in Tomato Plants Against Fusarium Wilt Disease by Bioagent Fungi (Arbuscular Mycorrhiza) And/or Hormonal Elicitors (Jasmonic Acid& Salicylic Acid): 1- Changes in Growth, Some Metabolic Activities and Endogenous Hormones Related to Defence Mechanism. *Australian Journal of Basic and Applied Sciences*, 1(4), pp. 691-705.
- EPPO (2011a) First report of *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* in Switzerland, EPPO Reporting Service 2011/168. Disponível no site [eppo.int](https://gd.eppo.int/reporting/article-1737), URL: <https://gd.eppo.int/reporting/article-1737>. Consultado a 16 de outubro de 2018.
- EPPO (2011b) First report of *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* in Australia, EPPO Reporting Service 2011/130. Disponível no site [eppo.int](https://gd.eppo.int/reporting/article-1699), URL: <https://gd.eppo.int/reporting/article-1699>. Consultado a 16 de outubro de 2018.
- EPPO (2011c) First report of *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* in Chile. EPPO Reporting Service 2011/055. Disponível no site [eppo.int](https://gd.eppo.int/reporting/article-137), URL: <https://gd.eppo.int/reporting/article-137>. Consultado a 16 de outubro de 2018.

- EPPO (2013) First report of *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* in Germany, EPPO Reporting Service 2013/185. disponível no site eppo.int, URL: <https://gd.eppo.int/reporting/article-2647>. Consultado a 16 de outubro de 2018.
- EPPO (2018a). EPPO A2 List of pests recommended for regulation as quarantine pests. Disponível no site eppo.int, URL: https://www.eppo.int/ACTIVITIES/plant_quarantine/A2_list. Consultado a 16 de outubro de 2018.
- EPPO (2018b). *Pseudomonas syringae* pv. *Actinidiae* Disponível no site eppo.int, URL: <https://gd.eppo.int/taxon/PSDMAK/distribution>. Consultado a 16 de outubro de 2018.
- EPPO. (2014). *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae*. EPPO Bulletin, 44(3), pp. 360–375.
- EPPO. (2016). Assignment of *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* biovar 4 to *Pseudomonas syringae* pv. *actinidifoliorum* pv. *nov.*. Reporting Service no. 04 – 2016, Num. article: 2016/080. Disponível no site eppo.int, URL: <https://gd.eppo.int/reporting/article-5545>. Consultado a 16 de outubro de 2018.
- Everett, K. R., Pushparajah, I. P. S., & Vergara, M. J. (2012). *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* on surfaces in the orchard. New Zealand Plant Protection, 65, pp. 19–24.
- Everett, K. R., Taylor, R. K., Romberg, M. K., Rees-George, J., Fullerton, R. A., Vanneste, J. L. & Manning, M. A. (2011) First report of *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* causing kiwifruit bacterial canker in New Zealand. Australasian Plant Dis. Notes (2011) 6, pp.67–71.
- FAO (2008). Climate-Relates Transboundary Pests and Diseases. Technical Background Document from The Expert Consultation Held on 25 to 27 February 2008, Rome, 59 pp.
- FAOSTAT. (2019). Food and agriculture organization of the United Nations - Statistic division. Site disponível: <http://www.fao.org/faostat/en/#data>. Consultado a 20 de fevereiro de 2019.
- Félix, A. e Cavaco, M. (2004). Caracterização do ecossistema agrário da cultura da actinídea (*Actinídea deliciosa* A. CHEV.) (*Actinidiaceae*). In VII - Encontro Nacional de Protecção Integrada, Escola Superior Agrária de Coimbra, 1–8.

- Félix, A. P., Cavaco, M. e Xavier, A. (2008). 14. Pragas da Cultura. In *Kiwi Da produção à comercialização*, Antunes, M. D. (Eds.), Ciências da Terra, Universidade do Algarve, pp. 120-132.
- Ferguson, A. R. (1984). Kiwifruit: A Botanical Review. In *Horticultural Reviews*, Fretz, T.A., Lipton, W.J. and Proctor J.T.A. (Eds), AVI Publishing Company, INC., Westport, Connecticut, Vol. 6, 436 pp.
- Ferguson, A. R. (2013). Chapter 2: Kiwifruit. The Wild and the Cultivated Plants. In *Nutritional Benefits of Kiwifruit*, Eds Mike Boland, Paul J. Moughan, Elsevier Inc., Advances in Food and Nutrition Research, Vol. 68, pp. 15–32.
- Ferguson, A. R., & Stanley, R. (2003). Kiwifruit. In *Encyclopedia of food sciences and nutrition*, Caballero, B. (Eds), Academic Press, Oxford, pp. 3425–3431.
- Ferrante P., Scortichini M. (2015). Redefining the global populations of *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* based on pathogenic, molecular and phenotypic characteristics. *Plant Pathology* 64, pp. 51–62. DOI: 10.1111/ppa.12236.
- Ferrante, P. & Scortichini, M. (2010). Molecular and phenotypic features of *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* isolated during recent epidemics of bacterial canker on yellow kiwifruit (*Actinidia chinensis*) in central Italy. *Plant Pathology*, 59, 5, pp. 954–962. DOI: 10.1111/j.1365-3059.2010.02304.x.
- Ferrante, P. & Scortichini, M. (2014). Frost promotes the pathogenicity of *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* in *Actinidia chinensis* and *A. deliciosa* plants. *Plant Pathology*, 63, 1, pp. 12–19. DOI: 10.1111/ppa.12070.
- Frampton, R. A., Taylor, C., Holguín Moreno, A. V., Visnovsky, S. B., Petty, N. K., Pitman, A. R. & Fineran, P. C. (2014). Identification of bacteriophages for biocontrol of the kiwifruit canker phytopathogen *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae*. *Applied and Environmental Microbiology*, 80 (7), pp. 2216–2228. DOI: 10.1128/AEM.00062-14.
- Freeman, B. C. & Beattie, G. A. (2008). An Overview of Plant Defenses against Pathogens and Herbivores. *Plant Pathology and Microbiology*, Iowa State University, 12p. DOI: 10.1094/PHI-I-2008-0226-01.

- Froudab, K. J., Beresfordc, R. M. and Coggerb, N. C. (2017). Impact of kiwifruit bacterial canker on productivity of cv. Hayward kiwifruit using observational data and multivariable analysis. *Plant Pathology*, 11p.. DOI: 10.1111/ppa.12764
- Frutas, Legumes e Flores (2007). Polinização complementar em kiwi. In Frutas, Legumes e Flores, nº 97 novembro/dezembro, disponível no URL: http://www.drapc.minagricultura.pt/base/geral/files/polinizacao_complementar_kiwi.pdf. Consultado a 5 de setembro.
- Fujikawa, T., & Sawada, H. (2016). Genome analysis of the kiwifruit canker pathogen *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* biovar 5. *Nature Publishing Group*, (February), pp. 1–11. DOI: 10.1038/srep21399.
- Gallelli, A., Aurora, A. L. and Loreti, S., (2011). Gene sequence analysis for the different PCR-based approaches for molecular typing of *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* strains from Italy. *Canadian Journal of Plant Pathology*, 33, pp. 8–18. DOI: 10.1080/07060661.2010.538556.
- Gallelli, A., Talocci, S., Pilotti, M., and Loreti, S. (2013). Real-time and qualitative PCR for detecting *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* isolates causing recent outbreaks of kiwifruit bacterial canker. *Plant Pathology* 63, pp. 264–276. DOI: 10.1111/ppa.12082.
- Gamon, J., and Surfus. J., (1999). Assessing leaf pigment content and activity with a reflectometer. *New Phytologist* 143, pp. 105–117. DOI: 10.1046/j.1469-8137.1999.00424.x.
- Gao, X., Huang, Q., Zhao, Z., Han, Q., Ke, X., Qin, H. and Huang, L. (). Studies on the Infection, Colonization, and Movement of *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* in Kiwifruit Tissues Using a GFPuv-Labeled Strain. *Plos one* (11) 3, 14p. DOI: 10.1371/journal.pone.0151169.
- Garcia, E. (2015). Variabilidade genética e fenotípica de *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae*, agente causal do cancro da actínídea, na Região Entre Douro e Minho, 93pp.
- Garcia, E., Moura, L., Abelleira, A., Aguín, O, Ares, A. and Mansilla, P. (2018). Characterization of *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* biovar 3 on kiwifruit in

- northwest Portugal. Journal of Applied Microbiology. 125, pp. 1147-1161. DOI:10.1111/jam.13943.
- García, Rubio, J.C., García González De Lena, G. & Ciordia-Ara, M. (2015). El cultivo del kiwi. Servicio Regional de Investigación y Desarrollo Agroalimentario, pp. 139
- Gardner, B. M. C. (2004). Ecology of *Bacillus* and *Paenibacillus* spp. in Agricultural Systems. Phytopathology, 94 (11), pp. 1252-1258 DOI: 10.1094/PHYTO.2004.94.11.-1252.
- Garmendia, I., Goicoechea, N. and Aguirreolea, J. (2004). Antioxidant Metabolism in Asymptomatic Leaves of *Verticillium*-infected Pepper Associated with an Arbuscular Mycorrhizal Fungus. Journal Phytopathology ,152, pp. 593–599. DOI: 10.1111/j.1439-0434.2004.00901.x.
- Goicoechea, N., Aguirreolea, J., Cenoz, S., García-Mina, J. M. (2000). *Verticillium dahliae* modifies the concentrations of proline, soluble sugars, starch, soluble protein and abscisic acid in pepper plants. Euro Journal Plant Pathology, 106, pp. 19–25. DOI: 10.1023/A:100872481.
- Goy, R. C., de Britto & Assis Odilio B. G. (2009). A Review of the Antimicrobial Activity of Chitosan. Polímeros: Ciência e Tecnologia, vol. 19, nº 3, 241-247 pp. DOI: 10.1590/S0104-1428200900030001.
- Guo X. M., Xiao X., Wang G. X., Gao R. F. (2013). Vascular Anatomy of Kiwi Fruit and its Implications for the Origin of Carpels. Front Plant Science. 4:391. DOI: 10.3389/fpls.2013.00391.
- Guroo, I., Wani, S. A., Wani, S. M., Ahmad, M., Mir, S. A. and Massodi, F. A. (2017). A Review of Production and Processing of Kiwifruit. Journal of Food Processing and Technology, vol. 8, issue 10, 6 p.. DOI: 10.4172/2157-7110.1000699.
- Gutha, L. R., Casassa, L. F., Harbertson, J. F. and Naidu, R. A. (2010). Modulation of flavonoid biosynthetic pathway genes and anthocyanins due to virus infection in grapevine (*Vitis vinifera* L.) leaves. BMC Plant Biology, 10:187, 18p. DOI: 10.1186/1471-2229-10-187.

- Han, H., Koh, Y., Hur, J.-S., & Jung, J. (2003). Identification and characterization of coronatine-producing *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae*. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 13, pp. 110–118. DOI:
- Hanssen, I.M., van Esse, H.P., Ballester, A. R., Hogewoning, S. W., Parra, N. O., Paeleman, A., Lievens, B., Bovy, A. G., Thomma, B. P. (2011). Differential tomato transcriptomic responses induced by pepino mosaic virus isolates with differential aggressiveness. *Plant Physiology* 156, pp. 301–318. DOI: 10.1104/pp.111.173906.
- Hanstech Instruments (2018) Disponível no site HanstechInstruments.com, URL:<http://www.hansatech-instruments.com/products/introduction-to-chlorophyll-fluorescence/continuous-excitation-chlorophyll-fluorescence/handy-pea/>. Consultado a 30 de Outubro de 2018.
- Hardwick, N. V. (2002). Weather and plant diseases. *Weather* Vol. 57, pp. 184-190.
- Harvey, C.F., Fraser L.G., Pavis S.E. & Considine, J.A. (1987). Floral Biology of Two Species of Actinidia (Actinidiaceae). I. The Stigma, Pollination, and Fertilization. In *Botanical Gazette*, The University of Chicago Vol. 148, No. 4 (Dec), pp. 426-432.
- Hikosaka, K., Noguchi, k., Terashima, I. (2016). 3 Modeling Leaf Gas Exchange. In *Canopy Photosynthesis: From Basics to Applications*. Hikosaka, K., Niinemets, Ü., Anten, N. (Eds.), Springer Dordrecht Heidelberg New York London, pp. 62-93
- Hill, R. (2013). Research to help control Psa in New Zealand kiwifruit orchards. Newsletter, June 2013, Bio-Protection, Bioprotection science for New Zeland, 6 pp. Disponível no site, URL: <http://www.lincoln.ac.nz/Documents/bioprotection/newsletters/-2013%20june%20newsletter.pdf>. Consultado a 10 de novembro de 2018.
- Hill, R., Stark, C., Cummings, N., Elmer, P, and Hoyte, S. (2015). Use of Beneficial Microorganisms and Elicitors for Control of *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* in Kiwifruit (*Actinidia* spp.). *Acta Horticulture* 1095, pp. 137-144. DOI: 10.17660/ActaHortic.2015.1095.17.
- Hirano, S. S. & Upper, C. D. (2000). Bacteria in the leaf ecosystem with emphasis on *Pseudomonas syringae*-a pathogen, ice nucleus, and epiphyte. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, Vol. 64, No 3, pp. 624–653. DOI: 10.1128/MMBR.64.3.624-653.2000.

- Holeva, M.C., Glynos, P. E. and Karafla, C. D. (2015). First Report of Bacterial Canker of Kiwifruit Caused by *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* in Greece. The American Phytopathology Society, Vol. 9, nº. 5, 723. DOI: 10.1094/PDIS-07-14-0738-PDN.
- Huang H., Wang S., Jiang Z. & Zhong C. (2012). ‘Jinyan’, an interspecific hybrid kiwifruit with Brilliant Yellow Flesh and Good Storage Quality. HortScience, 47, 1187–90.
- Huang, H. (2016). The kiwifruit: The genus Actinidia. Wuhan Botanical Garden, Chinese Academy of Sciences, Wuhan, China, 352pp.
- Hunag, H, and Fergunson, A. R. (2007). 1. Genetic Resources of Kiwifruit: Domestication and Breeding. In *Horticultural Reviews*, Luca Corelli-Grappadelli, Rina Kamenestky and Robert Prange (Eds), John Wiley & Sons, Inc., Horticultural Reviews Volume 33, pp. 1-102.
- INE, I. P., 2018. Estatísticas Agrícolas 2017. Lisboa, Portugal, 170 pp.
- Iqbal, M. J., Goodwin, P. H., Leonardos, E. D. and Grodzinski, B. (2012). Spatial and temporal changes in chlorophyll fluorescence images of *Nicotiana benthamiana* leaves following inoculation with *Pseudomonas syringae* pv. *Tabaci*. Plant Pathology, vol. 61, Issue 6, pp. 1052-1062. DOI: 10.1111/j.1365-3059.2012.02592.x.
- Iriarte, F. B., Balogh, B., & Momol, M. T. (2007). Factors affecting survival of bacteriophage on tomato leaf surfaces. Applied and Environmental Microbiology, 73(6), pp. 1704–1711. DOI: 10.1128/AEM.02118-06.
- Irigoyen, J.J. Einerich, D.W. and Sánchez-Díaz, M. (1992). Water stress induced changes in concentrations of proline and total soluble sugars in nodulated alfalfa (*Medicago sativa*) plants. *Physiologia plantarum*, 84(1), 55-60. DOI: 10.1111/j.1399-3054.1992.tb08764.x.
- ITIS (Integrated Taxonomic Information System on-line database) (2018). Site disponível: ITIS (Última Atualização: 8 de novembro de 2017), URL: https://www.itis.gov/servlet/SingleRpt/SingleRpt?search_topic=TSN&search_value=500824#null. Consultado a 7 de agosto de 2018.
- Kautsky, H. and Hirsch, A. (1931). Neue Versuche zur Kohlensäure-assimilation. *Naturwiss*, 19, pp. 964-964. DOI: 10.1007/BF01516164.

- Keane, P. (2012). How pathogens attack plants. *Microbiology Australia*, 33(1), 26-28.
- Kim, G. H., Jung, J. S., & Koh, Y. J. (2017). Occurrence and Epidemics of Bacterial Canker of Kiwifruit in Korea, *Plant Pathology Journal*, 33(4), pp. 351–361. DOI: 10.5423/PPJ.RW.01.2017.0021
- King, E. O., Ward, M. K. e Raney, D. E., (1954) Two simple media for the demonstration of pyocyanin and fluorescin. *The Journal of laboratory and clinical medicine*, 44, pp. 301–7.
- Klughammer C. & Schreiber U. (2008). PS II Quantum Yields 27 Complementary PS II quantum yields calculated from simple fluorescence parameters measured by PAM fluorometry and the Saturation Pulse method. *PAM Application Notes 1: 27 -35*
- Kornyeyev D., Holaday S. & Logan B. (2003). Predicting the extent of photosystem II photoinactivation using chlorophyll a fluorescence parameters measured during illumination. *Plant & Cell Physiology* 44(10), pp. 1064-1070. DOI: 10.1093/pcp/pcg129.
- Krause, G. H. Virgo, A. & Winter, K. (1995). High susceptibility to photoinhibition of young leaves of tropical forest trees. *Planta*, 197:4, pp. 583-591. DOI: 10.1007/BF00191564.
- KVH (Kiwifruit Vine Health) (2017) Kiwifruit risk organisms. Disponível no URL: <http://www.kvh.org.nz/vdb/document/91544>. Consultado a 10 de outubro de 2018.
- Leegood R.C. (1993). 16 Carbon metabolism. In *Photosynthesis and Production in a Changing Environment*, Hall D.O., Scurlock J.M.O., Bolhàr Nordenkamp H.R., Leegood R.C., Long S.P. (Eds). Springer, Dordrecht, pp. 247-267.
- Lelliott, R. A., Billing, E. and Hayward, A. C. (1966). A determinative scheme for the fluorescent plant pathogenic pseudomonads. *Journal of Applied Bacteriology*, 29, pp. 470–89.
- Li ,D., Tian, M., Cai, J., Jiang D., Cao, W. & Dai, T. (2013). Effects of low nitrogen supply on relationships between photosynthesis and nitrogen status at different leaf position in wheat seedlings. *Plant Growth Regulation* 70 (3), pp. 257-263. DOI: 10.1007/s10725-013-9797-4

- Li D., Tian M., Cai J., Jiang D., Cao W. & Dai T. (2013) Effects of low nitrogen supply on relationships between photosynthesis and nitrogen status at different leaf position in wheat seedlings. *Plant Growth Regulation* 70(3), pp. 257-263. DOI: 10.1007/s10725-013-9797-4
- Li, H-L. (1952). A taxonomic review of the genus *Actinidia*. *Journal of the Arnold Arboretum*, Vol. 33, No. 1 (January 1952), pp. 1-61.
- Li, J.Q., Li, X.W., Soejarto, D.D., (2007). Actinidiaceae. In *Flora of China*, Wu, Z.Y., Raven, P.H., Hong, D.Y. (Eds.), Science Press/Missouri Botanical Gardens, Beijing/St. Louis, MO, vol. 12, pp. 334–360.
- Li, X., Sun, Z., Shao, S., Zhang, S., Ahammed, G. J., Zhang, G., Jiang, Y., Zhou, J., Xia, X., Zhou, Y., Yu, J., Shi, K. (2015). Tomato–*Pseudomonas syringae* interactions under elevated CO₂ concentration: the role of stomata. *Journal of Experimental Botany*, Vol. 66, Issue 1, pp. 307–316. DOI: 10.1093/jxb/eru420.
- Liang, C. F. (1983). On the distribution of Actinidias. *Guihaia* 3, pp.229–248.
- Lobato, A. K. S., Gonçalves-Vidigal, M. C., Vidigal Filho P.S., Costa R. C. L., Cruz F. J. R., Santos D. G. S., Silva C. R., Silva L. I., Souza L. L. (2009). Changes in photosynthetic pigment and carbohydrate content in common bean cultivars infected by *Colletotrichum lindemuthianum*. *Plant, Soil and Environment* 55: pp.58-61. DOI: 10.17221/259-PSE
- Lobato, A. K. S., Gonçalves-Vidigal, M. C., Vidigal Filho, P. S., Andrade, C. A. B., Kvitschal, M. V. & Bonato C. M. (2010). Relationships between leaf pigments and photosynthesis in common bean plants infected by anthracnose. *New Zealand Journal of Crop and Horticultural Science*, 38:1, pp.29-37. DOI: 10.1080/01140671003619308.
- López-Gresa, M. P., Lisón, P., Campos, L., Rodrigo, I., Rambla, J. L., Granell, A., Conejero, V., Bellés, J. M. (2017). A Non-targeted Metabolomics Approach Unravels the VOCs Associated with the Tomato Immune Response against *Pseudomonas syringae*. *Front Plant Science*, vol. 8, article 1188. DOI: 10.3389/fpls.2017.01188.
- LPSN (List of Prokaryotic Names With Standing In Nomenclature) (2018). Genus *Pseudomonas*. Site disponível bacterio.net, URL:<http://www.bacterio.net/-pseudomonas.html>. Consultado em 26 de setembro de 2018.

- Lui, K. (2017). This Kiwifruit Isn't From New Zealand at All. It's Chinese, and This Is How It Got Hijacked. In *TIME*, 9 fevereiro de 2017. Site disponível TIME, URL: <http://time.com/4662293/kiwifruit-chinese-gooseberry-new-zealand-history-fruit/>. Consultado a 3 de agosto de 2018.
- Major, I. T., Nicole, M. C., Duplessis, S. and Séguin, A. (2010). Photosynthetic and respiratory changes in leaves of poplar elicited by rust infection. *Photosynthesis Research*, 104, pp. 41–48. DOI: 10.1007/s11120-009-9507-2.
- Marcelletti, S., Ferrante, P., Petriccione, M., Firrao, G. and Scortichini, M. (2011). *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* draft genomes comparison reveal strainspecific features involved in adaptation and virulence to *Actinidia* species. *PloS one*, 6, 11, pp. 1–17. DOI: 10.1371/journal.pone.0027297.
- Marín, D., Martín, M., Serrot P. H., Sabater, B. (2014). Thermodynamic balance of photosynthesis and transpiration at increasing CO₂ concentrations and rapid light fluctuations. *BioSystems*, 116, pp. 21–26. DOI: 10.1016/j.biosystems.2013.12.003.
- Mariz-Ponte, N., Mendes, R. J., Sario, S., Ferreira de Oliveira, J. M. P., Melo, P. Santos, C. (2018). Tomato plants use non-enzymatic antioxidant pathways to cope with moderate UV-A/B irradiation: A contribution to the use of UV-A/B in horticulture. *Journal of Plant Physiology* 221, pp. 32–42. DOI: 10.1016/j.jplph.2017.11.013
- Martinho, J. (2006). Entrevista ao Eng.º José Martinho, Presidente da APK – Associação Portuguesa de kiwicultores de Portugal. In *APH*, Revista da APH nº. 86, julho/agosto/setembro, pp. 21-26.
- Masami, N., Masao, G., & Katsumi, A. (2004). Nucleotide sequence and organization of copper resistance genes from *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae*. *European Journal of Plant Pathology*, 110 (2), pp. 223–226. DOI: 10.1023/B:EJPP.0000015360.88352.a9.
- Maxwell, K. & Johnson, G. (2000). Chlorophyll fluorescence – a practical guide. *Journal of Experimental Botany*, vol. 51, No. 345, pp. 659-668. DOI: 10.1093/jexbot/51.345.659.
- Mazarei, M. & Mostofipour, P. (1994). First report of bacterial canker of kiwifruit in Iran. *Plant Pathology*, 43, 1055–1056. DOI: 10.1111/j.1365-3059.1994.tb01658.x.

- Mazzaglia, A., Renzi, M. and Balestra, G. M. (2011). Comparison and utilization of molecular detection of *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae*: developing diagnostic protocols. *Journal of Plant Pathology* 93, 2, pp. 425–435.
- McAtee, P., Brian, L., Curran, B., van der Linden, O., Nieuwenhuizen, N., Henry-Kirk, R., Nardozza, S., Rikkerink, E. H. A., Print, C. and Allan, A. C., (). Re-programming of *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* gene expression during early stages of infection of kiwifruit. *BMC Genomics*, 19:822, 15p.. DOI: 10.1186/s12864-018-5197-5
- McCann H.C., Li L., Liu, Y., Li D., Pan, H., Zhong, C., Rikkerink, E.H.A., Templeton, M.D., Straub C., Colombi E., Rainey P.B. and Huang. H. (2017). Origin and Evolution of the Kiwifruit Canker Pandemic. *Genome Biology and Evolution*, 9, pp. 932–944. DOI: 10.1093/gbe/evx055.
- McCann, H.C., Rikkerink, E.H., Bertels, F., Fiers, M., Lu, A., ReesGeorge, J., Andersen, M.T., Gleave, A.P., Haubold, B., Wohlers, M.W., Guttman, D.S., Wang, P.W., Straub, C., Vanneste, J.L., Rainey, P.B., Templeton, M.D. (2013) Genomic analysis of the kiwifruit pathogen *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* provides insight into the origins of an emergent plant disease. *PLOS Pathogenes*, Vol. 9, issue 7. DOI: 10.1371/journal.ppat.1003503
- Montanaro, G., dichio, B., and xiloyannis, C. (2007). Response of photosynthetic machinery of field-grown kiwifruit under Mediterranean conditions during drought and re-watering. *Photosynthetica*, 45 (4), pp. 533-540. DOI: 10.1007/s11099-007-0091-4.
- Montes, C. P. (2017). Estudio del papel defensivo y del mecanismo de acción de los ésteres del (Z)- 3-hexenol en plantas de tomate frente a *Pseudomonas syringae*. Universidade Politecnica de Valencia – Escola Tecnica Superior de Engenharia Agronomica e do Meio Natural, Trabalho de Fim de Curso.
- Moreira, J. F. e Coutinho, C., 2014. Circular no:17/2014. *Avisos Agrícolas – Estação de avisos de Entre Douro e Minho*, 1-6. Disponível no site drapnorte.gov.pt, URL: http://www.drapn.min-agricultura.pt/drapn/conteudos/edm/Circular_17_2014.pdf. Consultado a 22 de setembro de 2018.
- Moura, L. (2013). O cancro bacteriano do kiwi causado por *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae*. *Vida Rural*, pp. 36–38.

- Naseem, H. & Bano, A. (2014). Role of PGPR and their Exopolysaccharide (EPS) in drought tolerance of maize. *Journal of Plant Interactions*, pp. 689-701. DOI: 10.1080/17429145.2014.902125.
- NCBI (National Center for Biotechnology Information) (2018). Site disponível: NCBI, URL: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi?mode=Info&id=3624&lvl=3&keep=1&srchmode=1&unlock&lin=f&log_op=lineage_toggle. Consultado a 7 de agosto de 2018.
- Niyogi, K. K., Björkman, O., and Grossman, A. R. (1997). The roles of specific xanthophylls in photoprotection. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 94, pp. 14162–14167. DOI: 10.1073/pnas.94.25.14162.
- Nobori, T., Mine, A. and Tsuda, K. (2018). Molecular networks in plant-pathogen holobiont. DOI: 10.1002/1873-3468.13071.
- Oliveira, M. (2004). Estados fenológicos da actinídea. Direcção Geral de Agricultura Entre Douro e Minho Disponível no URL: http://www.drapc.min-agricultura.pt/base/geral/files/estados_fenologicos_actinidea.jpg. Consultado a 20 de agosto de 2018.
- Oliveira, M. e Veloso, F. (2008). 6. Exigências Edafo-Climáticas. In *Kiwi Da produção à comercialização*, Antunes, M. D. (Eds.), Ciências da Terra, Universidade do Algarve, pp. 43-53.
- Osaki, M., Koyanagi, A., and Tadano, T. (1992). Behavior of carbon from sucrose and asparagine after introduction to flag leaf of rice plant during ripening. *Soil Science and Plant Nutrition*, 38(3), pp. 527-535. DOI: 10.1080/00380768.1992.10415084.
- Özen, A. I. and Ussery, W. D. (2012). Defining the *Pseudomonas* Genus: Where Do We Draw the Line with *Azotobacter*?. *Microbial Ecology*, 63, pp. 239–248. DOI: 10.1007/s00248-011-9914-8.
- Palleroni, N.J. (2005). Genus I. *Pseudomonas* Migula 1894, 237^{AL}. In *Bergey's manual of systematic bacteriology*, Brenner, D.J., Krieg, N.R., Staley, J.T., Garrity, G.M. (Eds)). Boston, Springer, vol. 2, pp. 323-379.

- Peix, A.; Ramírez-Bahena, M. and Velázquez, E. (2009) Historical evolution and current status of the taxonomy of genus *Pseudomonas*. *Infection, Genetics and Evolution* 9, pp. 1132–1147. DOI: 10.1016/j.meegid.2009.08.001.
- Peloso, A. F., Dan Tatagiba, S., Reis, E. F., Pezzopane, J. E. M. e do Amaral, J. F. T. (2016). Limitações fotossintéticas em folhas de cafeeiro arábica promovidas pelo déficit hídrico. *Coffee Science*, Lavras, v. 12, n. 3, pp. 389 – 399. DOI: 10.25186/cs.v12i3.1314.
- Petriccione, M., Di Cecco, I., Arena, S., Scaloni, A. and Scortichini, M. (2013). Proteomic changes in *Actinidia chinensis* shoot during systemic infection with a pandemic *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* strain. *Journal of Proteomics*, 78, pp. 461 – 476. DOI: 10.1016/j.jprot.2012.10.014.
- Plant Disease (1999). The Weather and Plant Diseases. Report on Plante Disease. RPD No. 1003, Department of Crop Sciences University of Illinois at Urbana-Champaign, 6 pp.
- Poulter, R., Taiaroa, G., Sumpter, N., Stockwell, Butler, M. (2017) Complete Genome Sequence of the Kiwifruit Pathogen *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* Biovar 5, Originating from Japan. *Genome Announc* 5: e01409-17, American Society for Microbiology, Volume 5, Issue 50, 2p. DOI: 10.1128/genomeA.01409-17.
- Prencipe, S., Nari, L., Vittone, G., Gullino, M. L., & Spadaro, D. (2016). Effect of bacterial canker caused by *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* on postharvest quality and rots of kiwifruit “Hayward.” *Postharvest Biology and Technology*, 113, 119–124. DOI: 10.1016/j.postharvbio.2015.11.010
- R. Sayar, R., Khemira, H., Kameli, A. and Mosbahi, M. (2008). Physiological tests as predictive appreciation for drought tolerance in durum wheat (*Triticum durum* Desf.). *Agronomy Research* 6(1), pp. 79–90.
- Rajendran, D. K., Park, E., Nagendran, R., Hung, N. B., Cho, B., Kim, K. and Lee, Y. H. (2016). Visual Analysis for Detection and Quantification of *Pseudomonas cichorii* Disease Severity in Tomato Plants. *Plant Pathology Journal*, 32(4), pp. 300-310. DOI: 10.5423/PPJ.OA.01.2016.0032.
- Rajendran, D. K., Park, E., Nagendran, R., Hung, N. B., Cho, B., Kim, K. and Hoon Lee, Y. H. (2016). Visual Analysis for Detection and Quantification of *Pseudomonas cichorii*

- Disease Severity in Tomato Plants. The Plant Pathology Journal, Vol. 31, Issue 4, pp. 300-310. DOI: 10.5423/PPJ.OA.01.2016.0032.
- Ramsfield, T. D. (2006). Risk Assessment of inundative biological control with *Chondrostereum purpureum* in New Zealand. New Zealand Journal of Forestry Science 36, Reprint No. 2867, pp 11–20.
- Reglinski, T., Vanneste, J. L., Wurms, K., Gould, E., Spinelli, F., & Rikkerink, E. (2013). Using fundamental knowledge of induced resistance to develop control strategies for bacterial canker of kiwifruit caused by *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae*. Frontiers in Plant Science, 4 (February), 24 pp. DOI: 10.3389/fpls.2013.00024.
- Richardson, D. P., Ansell, J. & Drummond, L. N., (2018). The nutritional and health attributes of kiwifruit: a review. European Journal of Nutrition, pp. 1-18. DOI: 10.1007/s00394-018-1627-z.
- Ritz T., Damjanovic´ A., Schulten K., Zhang J. P., and Koyama Y. (2000). Efficient light harvesting through carotenoids. Photosynthesis Research 66, pp. 125–144. DOI: 10.1023/A:101075033.
- Roitsch, T., Balibrea, M. E., Hofmann, M., Proels, R., Sinha, A. K. (2003). Extracellular invertase: key metabolic enzyme and PR protein. Journal of Experimental Botany, Vol. 54, No. 382, pp. 513-524. DOI: 10.1093/jxb/erg050.
- Rojas, C. M., Senthil-Kumar, M., Tzin, V. and Mysore, K. S. (2014). Regulation of primary plant metabolism during plant-pathogen interactions and its contribution to plant defense. Frontier in Plant Science, February, Volume 5, Article 17, pp. 1-12. DOI: 10.3389/fpls.2014.00017.
- Ruinellia, M., Schneeberger, P. H. H., Ferrante, P., Bühlmann, A., Scortichini, M., Vanneste, J. L., Duffya, B and Pothiera, J. F. (2016). Comparative genomics-informed design of two LAMP assays for detection of the kiwifruit pathogen *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* and discrimination of isolates belonging to the pandemic biovar 3. Plant Pathology, 10 pp. DOI: 10.1111/ppa.12551.
- Salinero, C., Martinho, J. (1997). *Actinidia deliciosa* (A. Chevalier, C. F. Liang *et al.*, A. R. Ferguson), Ficha técnica nº. 03/97, pp. 1-4. Site disponível efa-dip, URL: http://www.efa-dip.org/comun/publicaciones/FTecnicas/Download/03ok_kiwi.pdf. Consultado a 4 de setembro de 2018

- Salinero, M. C., Vela, P., Sainz, M. J. (2009). Phenological growth stages of kiwifruit (*Actinidia deliciosa* ‘Hayward’). *Scientia Horticulturae* 12, pp. 27–31. DOI: 10.1016/j.scienta.2009.01.013.
- Saliyan, T., Shakheel B., M., Satish S., and Hedge, K. (2017). A Review on *Actinidia deliciosa*. *International Journal of Pharma And Chemical Research*, Vol. 3, Issue 1, Jan – Mar.
- Samaniego-Gómez, B. Y., Garruña, R., Tun-Suárez, J. M., Kantun-Can, J., Reyes-Ramírez, A., and Cervantes-Díaz, L. (2016). *Bacillus* spp. inoculation improves photosystem II efficiency and enhances photosynthesis in pepper plants. *Chilean Journal of Agricultural Research* 76(4), pp. 409-416. DOI: 10.4067/S0718-58392016000400003.
- Sawada, H., Kondo, K., & Nakaune, R. (2016). Novel biovar (biovar 6) of *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* causing-bacterial canker of kiwifruit (*Actinidia deliciosa*) in Japanese. *Japanese Journal of Phytopathology*, 82, pp. 101–15. DOI: 10.3186/jjphytopath.82.101.
- Sawada, H., Miyoshi, T., & Ide, Y. (2014). Novel MLSA group (Psa5) of *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* causing bacterial canker of kiwifruit (*Actinidia chinensis*) in Japan. *Japanese Journal of Phytopathology*, 80, pp. 171–184. DOI: 10.3186/jjphytopath.80.171.
- Sawada, H., Shimizu, S., Miyoshi, T., Shinozaki, T., Kusumoto, S., Noguchi, M., Naridomi, T., Kiuhara, K., Kansako, M., Fujikawa, T. and Nakaune, R. (2015). Characterization of biovar 3 strains of *Pseudomonas syringae* pv. *Actinidiae* isolated in Japan. *Japan Journal Phytopathology* 81, pp. 111–126. DOI: 10.3186/jjphytopath.81.111.
- Schaberg P., Murakami, P., Turner, M., Heitz, H. and Hawley, G. (2008). Association of red coloration with senescence of sugar maple leaves in autumn. *Trees* 22, pp. 573–578. DOI: 10.1007/s00468-008-0217-8.
- Scholes, J. D. and Rolfe, S. A. (2009). Chlorophyll fluorescence imaging as tool for understanding the impact of fungal diseases on plant performance: a phenomics perspective. *Functional Plant Biology*, 36 (11), pp. 880-892. DOI: 10.1071/FP09145

- Scortichini M (1994) Occurrence of *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* on kiwifruit in Italy. Plant Pathology 43, pp. 1035–1038. DOI: 10.1111/j.1365-3059.1994.tb01654.x.
- Scortichini, M. (2014). Field efficacy of chitosan to control *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae*, the causal agent of kiwifruit bacterial canker. European Journal of Plant Pathology, (November), pp. 887–892. DOI: 10.1007/s10658-014-0515-5.
- Scortichini, M. (2018). Aspects still to solve for the management of kiwifruit bacterial canker caused by *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* biovar 3. Eur. J. Hortic. Sci. 83(4), pp. 205–211. DOI: 10.17660/eJHS.2018/83.4.1.
- Scortichini, M., Marcelletti, S., Ferrante, P., Petriccione, M., & Firrao, G. (2012). *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae*: A re-emerging, multi-faceted, pandemic pathogen. Molecular Plant Pathology, 13(7), pp. 631–640. DOI: 10.1111/j.1364-3703.2012.00788.x.
- Sepúlveda, P. & Soto, S. (2014). Avances en el control de Bacteriosis del kiwi causada por *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* (Psa) Revista fruticola, Coperfrut S. A., Vol. 36, nº. 2, 14-20 p.
- Serizawa, S. & Ichikawa, T., 1993. Epidemiology of bacterial canker of kiwifruit, 3: The seasonal changes of bacterial population in lesions and of its exudation from lesion. Annals of the Phytopathological Society of Japan, 59, Issue 4, pp. 469-476. DOI: 10.3186/jjphytopath.59.469.
- Serizawa, S., Ichikawa, T., Takikawa, Y., Tsuyumu, S. & Goto, M. (1989). Occurrence of bacterial canker of kiwifruit in Japan: description of symptoms, isolation of the pathogen and screening of bactericides. Annals of the Phytopathological Society of Japan 55, pp. 427–436. DOI: 10.3186/jjphytopath.55.427.
- Sharma, G., Sharma, O. C. and Thakur, B., S. (2009). Systematic of Fruit Crops. New India Publishing Agency, New-Delhi, pp. 337-347.
- Sims D.A., & Gamon J.A. (2002). Relationships between leaf pigment content and spectral reflectance across a wide range of species, leaf structures and developmental stages. Remote Sensing of Environment, 81 (2), pp. 337-354. DOI: 10.1016/S0034-4257(02)00010-X.

- Sofia, J. (2008). 18. Doenças da Actinídea. In *Kiwi Da produção à comercialização*, Antunes, M. D. (Eds.), Ciências da Terra, Universidade do Algarve, pp. 170-185.
- Sofia, J. M. (2003). Ocorrência de problemas fitossanitários em pomares de kiwi na Beira Litoral. Projeto Agro 231: Regularidade produtiva, qualidade e conservação dos frutos de actinídea nas Regiões de Entre Douro e Minho e Beira Litoral. Direção Regional de Agricultura da Beira Litoral, disponível URL: http://www.drapc.min-agricultura.pt/base/geral/files/problemas_fitoss_pomares_kiwi_bl.pdf. Consultado a 10 de agosto de 2018.
- Stefani, E., & Giovanardi, D. (2011). Dissemination of *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* through pollen and its epiphytic life on leaves and fruits. *Phytopathologia Mediterranea*, 50(3), pp. 489–496. DOI: 10.14601/Phytopathol_Mediterr-10287.
- Strik, B. and Cahn, H. (1998). Kiwi cultivars. In *Growing Kiwifruit*. Oregon State University, PNW 507 – reprinted september 2000, pp. 2-5.
- Swarthout, D., Emily Harper, Judd, S., Gonthier, D., Shyne, R., Stowe, T. and Bultman, T. (2009). Measures of leaf-level water-use efficiency in drought stressed endophyte infected and non-infected tall fescue grasses. *Environmental and Experimental Botany* 66, pp. 88–93. DOI: 10.1016/j.envexpbot.2008.12.002.
- T&G Global Limited (2017). Our Journey. Site disponível tandg.global, URL: <https://tandg.global/about/ourjourney/>. Consultado a 1 de setembro de 2018
- Takikawa, Y., Serizawa, S., Ichikawa, T., Tsuyumu, S. & Goto, M. (1989). *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* pv. nov.: the causal bacterium of canker of kiwifruit in Japan. *Annals of the Phytopathological Society of Japan* 55, pp. 437–444. DOI: 10.3186/jjphytopath.55.437.
- Tyl C., Sadler G. D. (2017). pH and Titratable Acidity. In *Food Analysis*, Nielsen S. (eds), Food Science Text Series. Springer, Cham, pp. 389-406.
- Vanneste (2010). *Pseudomonas syringae* pv. *Actinidiae*. In Pathogen of the month — July2010, APPS, 1pp. Disponível no site appsnet.org, URL: <https://www.appsnet.org/publications/-potm/pdf/Jul10.pdf>. Consultado a 26 de agosto de 2018.

- Vanneste JL (2017). The scientific, economic, and social impacts of the New Zealand outbreak of bacterial canker of kiwifruit (*Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae*). *Annual Review of Phytopathology* 55, pp. 377-99. DOI: 10.1146/annurev-phyto-080516-035530.
- Vanneste, J. L., Cornish, D. A., Yu, J. and Rivoal, C. (2011c). Presence of the effector gene hop A1 in strains of *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* isolated from France and Italy. *New Zealand Plant Protection*, 64, pp. 252–258. DOI: 10.1371/journal.pone.0027297
- Vanneste, J. L., Giovanardi, J., Yu, J., Cornish, D. A., Kay, C., Spinelli, F. and Stefani, E., (2011b). Detection of *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* in kiwifruit pollen samples. *New Zealand Plant Protection*, 64, pp. 246–251.
- Vanneste, J. L., Poliakoff, F., Audusseau, C., Cornish, D. A., Paillard, S., Rivoal, C., and Yu, J. (2011a) First report of *Pseudomonas syringae* pv *actinidiae* the causal agent of bacterial canker of Kiwifruit in France. *Plant Disease*, 95(10), 1311. DOI: 10.1094/PDIS-03-11-0195
- Vanneste, J. L., Yu, J., & Cornish, D. A. (2013). Identification, virulence and distribution of two biovars of *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* in New Zealand. *Plant Disease*, 97, pp. 708–719. DOI: doi.org/10.1094/PDIS-07-12-0700-RE.
- Vanneste, J.L., Kay, C., Onorato, R., Yu, J., Cornish, D.A., Spinelli, F., Max, S. (2011d). Recent advances in the characterisation and control of *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae*, the causal agent of bacterial canker on kiwifruit. In ISHS Acta Horticulturae 913: VII International Symposium on Kiwifruit. DOI: 10.17660/ActaHortic.2011.913.59.
- Vaz, A., Moura, M.L., Mourão, I. and Pereira, A.M. (2018b). Effect of *Bacillus subtilis* on fruit yield and quality in *Actinidia deliciosa* orchards infected with bacterial canker in the north of Portugal. *Acta Hortic.* 1218, 253-260. DOI: 10.17660/ActaHortic.2018.1218.34
<https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2018.1218.34>
- Vaz, A., Pereira, A.M., Brito, L.M. and Moura, M.L. (2018a). Efficacy of *Bacillus subtilis* for the control of *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* under field conditions. *Acta*

Hortic. 1218, 261-268. DOI: 10.17660/ActaHortic.2018.1218.35
<https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2018.1218.35>

- Vaz, P. (2017). A problemática do cancro bacteriano da *Actinidia* na região do Entre Douro e Minho. Dissertação de Mestrado em Engenharia Agronómica. Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro, 69p.
- Wang, T., Wang, G., Jia, Z. H., Pan, D. L., Zhang, J. Y. and Guo, Z. R. (2018). Transcriptome Analysis of Kiwifruit in Response to *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* Infection. *International Journal of Molecular Science*, 19, 373, 14 p.. DOI: 10.3390/ijms19020373.
- Wang, T., Wang, G., Jia, Z. H., Pan, D. L., Zhang, J. Y., Guo, Z. R. (2018). Transcriptome Analysis of Kiwifruit in Response to *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* Infection. *International Journal of Molecular Science*, 19, 373, 14 p.. DOI: 10.3390/ijms19020373.
- Ward, C., & Courtney, D. (2013). Kiwifruit: Taking Its Place in the Global Fruit Bowl. *Advances in Food and Nutrition Research*, 68, pp. 1–14. DOI: 10.1016/B978-0-12-394294-4.00001-8.
- Woodcock, S. (2016). A Review of Research and Development Undertaken on Psa. *Kiwifruit Vine Health*, 48 p. Disponível no site [kvh.co.nz](http://www.kvh.org.nz/vdb/document/103504), URL: <http://www.kvh.org.nz/vdb/document/103504>. Consultado a 26 de agosto de 2018.
- Wu Q., Su N., Shen W. & Cui J. (2014). Analyzing photosynthetic activity and growth of *Solanum lycopersicum* seedlings exposed to different light qualities. *Acta Physiologiae Plantarum*, 36 (6), pp.1411-1420. DOI: 10.1007/s11738-014-1519-7.
- Wurms, K. V., Hardaker, A. J., Ah Chee, A., Bowen, J., Phipps, J., Taylor, J., Jensen, D., Cooney, J., Wohlers, M. and Reglinski, T. (2017). Phytohormone and Putative Defense Gene Expression Differentiates the Response of 'Hayward' Kiwifruit to Psa and Pfm Infections. *Front Plant Science*, 8:1366, 15p.. DOI: 10.3389/fpls.2017.01366.
- Yamori, W., Makino, A. & Shikanai, T. (2016). A physiological role of cyclic electron transport around photosystem I in sustaining photosynthesis under fluctuating light in rice. *Scientific Reports*, 6:20147, 12p. DOI: 10.1038/srep20147.

- Yan, J.Y., (1981). Histoire d'*Actinidia chinensis* Planch. et conditions actuelles de sa production a l'étranger. J. Agric. Trad. Bot. Appl. 28, pp. 281–290.
- Yang, Y., Wang, M., Yin, Y., Onac, E., Zhou, G., Peng, S., Xia, X., Shi, K., Yu J. and Zhou, Y. (2015). RNA-seq analysis reveals the role of red light in resistance against *Pseudomonas syringae* pv. tomato DC3000 in tomato plants. BMC Genomics, 16:120, 16p. DOI: 10.1186/s12864-015-1228-7.
- Yildirim, B., Yeşiloğlu, T., Uysal-Kamiloğlu, M., İncesu, M., Tuzcu1, Ö. & Çimen, B. (2011). Pomological characterisation of different kiwifruit (*Actinidia deliciosa*) cultivars in Adana (Turkey). African Journal of Agricultural Research Vol. 6(6), pp. 1378-1382. DOI: 10.5897/AJAR10.507.
- Yu, J. G., Lim, J. A., Song, Y. R., Heu, S., Kim, G. H., Koh, Y. J., & Oh, C. S. (2015). Isolation and characterization of bacteriophages against *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* causing bacterial canker disease in kiwifruit. Journal of Microbiology and Biotechnology, 26(2), pp. 385–393. DOI: 10.4014/jmb.1509.09012.
- Yujie Yin, Pei'en Ni, Bohan Deng, Shiping Wang, Wenping Xu & Dapeng Wang (2018). Isolation and characterisation of phages against *Pseudomonas syringae* pv. *Actinidiae*. Acta Agriculturae Scandinavica, Section B — Soil & Plant Science, 10 p.. DOI: 10.1080/09064710.2018.1526965.
- Zespri (2018a). Kiwi. Site disponível Zespri, URL: <https://www.zespri.eu/pt>. Consultado a 1 de setembro de 2018.
- Zespri (2018b). What's new colour your palate red. Site disponível Zespri, URL: <http://zespri.com.sg/zespri-red-kiwifruit/>. Consultado a 4 de setembro.
- Zhongsu, W., Xianfu, T., Shaoji, L. (1992). Identification of the Pathogenic Bacterium for Bacterial Canker on *Actinidia* in Sichuan. Journal of southwest Agricultural University.

